

Nachweis und Charakterisierung des geschlossenen Blutgefäßsystems in murinen Röhrenknochen

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für Biologie an der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

M.sc. Anika Klingberg

Geboren am 09.10.1986 in Essen

eingereicht am: 11.10.2016

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für experimentelle Immunologie und Bildgebung der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Matthias Gunzer
2. Gutachter: Prof. Dr. Andrea Vortkamp
3. Gutachter: Prof. Dr. Gerhard Krönke

Vorsitzende des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Perihan Nalbant

Tag der mündlichen Prüfung: 18.01.2017

Publikationen während der Doktorarbeit

- **Klingberg, A.**, Hasenberg, A., Ludwig-Portugall, I., Medyukhina, A., Männ, L., Brenzel, A., Engel, D. R., Figge, M. T., Kurts, C., Gunzer, M.
Fully Automated Evaluation of Total Glomerular Number and Capillary Tuft Size in Nephritic Kidneys Using Lightsheet Microscopy.
Journal of the American Society of Nephrology, 28, 2016.
- Mann, L., Kochupurakkal, N., Martin, C., Verjans, E., **Klingberg, A.**, Sody, S., Kraus, A., Dalimot, J., Bergmüller, E., Jung, S., Voortman, S., Winterhager, E., Brandau, S., Garbi, N., Kurrer, M., Eriksson, U., Gunzer, M. and Hasenberg, M.
CD11c.DTR mice develop a fatal fulminant myocarditis after local or systemic treatment with diphtheria toxin.
European Journal of Immunology, 46(8):2028-42, 2016.
- Moses, K., Klein, J. C., Mann, L., **Klingberg, A.**, Gunzer, M., Brandau, S.
Survival of residual neutrophils and accelerated myelopoiesis limit the efficacy of antibody-mediated depletion of Ly-6G+ cells in tumor-bearing mice.
Journal of Leukocyte Biology, 99: 811-823, 2016.
- Hasenberg, A., Hasenberg, M., Mann, L., Neumann, F., Borkenstein, L., Stecher, M., Kraus, A., Engel, D. R., **Klingberg, A.**, Seddigh, P., Abdullah, Z., Klebow, S., Engelmann, S., Reinhold, A., Brandau, S., Seeling, M., Waisman, A., Schraven, B., Gothert, J. R., Nimmerjahn, F., Gunzer, M.
Catchup: a mouse model for imaging-based tracking and modulation of neutrophil granulocytes.
Nature Methods, 12: 445-452, 2015.
- Neumann, J., Riek-Burchardt, M., Herz, J., Doeppner, T. R., König, R., Hutten, H., Etemire, E., Mann, L., **Klingberg, A.**, Fischer, T., Gortler, M. W., Heinze, H. J., Reichardt, P., Schraven, B., Hermann, D. M., Reymann, K. G., Gunzer, M.
Very-late-antigen-4 (VLA-4)-mediated brain invasion by neutrophils leads to interactions with microglia, increased ischemic injury and impaired behavior in experimental stroke.
Acta Neuropathologica, 129: 259-277, 2015.

In Vorbereitung

- **Klingberg, A.**, Hawwari, I., Breuer, A., Müller, S., Lang, S., Kraff, O., Quick, H., Jäger, M., Landgräber, S., Kleier, A., Danuser, R., Stein, J., Rhode, M., Garbe, A., Kamradt, T., Schett, G., Hasenberg, A. and Gunzer, M.
A trans-diaphyseal network of vessels in the long bone

Manuskript liegt vor

Patente

- **Non-hazardous optical clearing of biological samples**
Patent-Nr.: 15197257.7
Anika Klingberg
Universität Duisburg-Essen

Preise

- 14. Forschungstag der medizinischen Fakultät und Fachschaft der Studierenden der Universität Duisburg-Essen, 2015
Posterpreis
„Fluorescence-preserving, non-toxic clearing of all tissue-types for multiple microscopy techniques”
- 12. Forschungstag der medizinischen Fakultät und Fachschaft der Studierenden der Universität Duisburg-Essen, 2013
Vortragspreis
„A complex network of trans-diaphyseal blood vessels: Highway for bone marrow-derived cells?”
- 12. Forschungstag der medizinischen Fakultät und Fachschaft der Studierenden der Universität Duisburg-Essen, 2013
Posterpreis
„A complex network of trans-diaphyseal blood vessels: Highway for bone marrow-derived cells?”

Vorträge

- **“Structure and function of trans-cortical capillaries in (human and murine) long bones”**
Gastvortrag, Montagsseminar Medizin 3, Universitätsklinikum Erlangen (2016, Erlangen)
- **“The role of the bone marrow vascular system for leukocyte/neutrophil mobilization”**
Gastvortrag, interne Klausurtagung, Kompetenznetzwerk Stammzellforschung NRW (2016, Herne)
- **“Fluorescence-preserving, non-toxic clearing of all tissue-types for multiple microscopy techniques”**
14. Forschungstag der medizinischen Fakultät und Fachschaft der Studierenden der Universität Duisburg-Essen (2015, Essen)

- **“Bone channels: Visualization and Function”**
Immunobone Projektmeeting (2015, Dresden)
- **“The role of CXCR2-ligands for neutrophil mobilization from the bone marrow to peripheral sites”**
Immunobone Projektmeeting (2014, Münster)
- **“A complex network of trans diaphyseal blood vessels: Highway for bone marrow-derived cells?”**
ZMB Lunch-Seminar (2014, Essen)
- **“The role of CXCR2-ligands for neutrophil mobilization from the bone marrow to peripheral sites”**
ZMB Lunch-Seminar (2014, Essen)
- **“A complex network of trans-diaphyseal blood vessels: Highway for bone marrow-derived cells?”**
Wintersimar der medizinischen Fakultät (2013, Pichl)
- **A complex network of trans-diaphyseal blood vessels: Highway for bone marrow-derived cells?”**
12. Forschungstag der medizinischen Fakultät und Fachschaft der Studierenden der Universität Duisburg-Essen (2013, Essen)
- **“A complex network of trans-diaphyseal blood vessels: Highway for bone marrow-derived cells?”**
ZMB Lunch-Seminar (2013, Essen)
- **“The role of CXCR2-ligands for neutrophil mobilization from the bone marrow to peripheral sites”**
Immunobone Projektmeeting (2013, Garmisch-Partenkirchen)
- **“The role of CXCR2-ligands for neutrophil mobilization from the bone marrow to peripheral sites”**
Immunobone Projektmeeting, (2012, Jena)

Poster-Präsentationen

- **„Fully Automated Evaluation of Total Glomerular Number and Capillary Tuft Size in Nephritic Kidneys Using Lightsheet Microscopy”**
Annual Meeting of German Society for Immunology (2016, Hamburg)
- **“A complex network of trans diaphyseal blood vessels: Highway for bone marrow-derived cells?”**
Immunobone Projektmeeting (2016, Hamburg)

- **“A complex network of trans diaphyseal blood vessels:Highway for bone marrow-derived cells?”**
European Congress for Immunology (2015, Wien)
- **“Fluorescence-preserving, non-toxic clearing of all tissue-types for multiple microscopy techniques”**
14. Forschungstag der medizinischen Fakultät und Fachschaft der Studierenden der Universität Duisburg-Essen (2015, Essen)
- **“A complex network of trans diaphyseal blood vessels:Highway for bone marrow-derived cells?”**
Annual Meeting of German Society for Immunology (2014, Bonn)
- **“A complex network of trans diaphyseal blood vessels:Highway for bone marrow-derived cells?”**
13. Forschungstag der medizinischen Fakultät und Fachschaft der Studierenden der Universität Duisburg-Essen (2014, Essen)
- **“The vascular system of the leg: Highway for bone marrow-derived cells?”**
Annual Meeting of German Society for Immunology (2013, Mainz)
- **“A complex network of trans-diaphyseal blood vessels: Highway for bone marrow-derived cells?”**
12. Forschungstag der medizinischen Fakultät und Fachschaft der Studierenden der Universität Duisburg-Essen (2013, Essen)

Abkürzungsverzeichnis

3D	drei-dimensional
°	Grad
%	Prozent
<	größer
α	Alpha, anti
β	Beta
γ	Gamma
κ	Kappa
μ	Mu, Mikro
π	Pi, Kreiszahl

A

A	Kreisfläche
Abb.	Abbildung
AF	AlexaFluor
Ang 1	Angiopoietin 1
Ang 2	Angiopoietin 2
ATP	Adenosintriphosphat

B

bFGF	basic fibroblast growth factor, Fibroblasten Wachstumsfaktor
BMP	bone morphogenic protein, Knochen-Morphogenese-Protein
BMPR	BMP-Rezeptor
BMU	basic multicellular units, multizelluläre Knochenbaustelle
BRC	bone remodeling compartment, Knochenumbau Areal
BSP	bone sila protein, Knochen Silaprotein

C

CA II	Carbonanhydrase II
Cat K	Cathepsin K
CFA	complete freund's adjuvant, Freund-Adjuvant
CLSM	confocal laser scanning microscopy, Konfokal-Mikroskopie
cm	Zentimeter
Cox-2	Cyclo-Oxygenase-2

D

DAP12	Adaptermolekül 12
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMP-1	Dentin Matrixprotein 1
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dp	Diaphyse
DPSSL	diode pumped solid state laser, Dioden-gepumpter Festkörperlaserlaser
dTKG	direktes trans-Kortikalgefäß

E

ECi	Ethyl cinnamate, Zimtsäureethylester
ECi	Ethyl cinnamate, Zimtsäureethylester
ELMI	Elektronenmikroskopie
Em.	Emission
ep	Epiphyse
Eph2	Ephrin-B2
Eph4	Ephrin-B4
et al.	et alii, und andere
EtOH	Ethanol
Ex.	Exzitation

F

FEMA	Flavor and Extract Manufacturers' Association
FGF 23	fibroblast growth factor 23, Fibroblasten Wachstumsfaktor 23
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FP	Fluoreszenzprotein
FP	Fluoreszenzprotein

G

g	Gramm
G6PI	Glucose-6-Phosphat Isomerase
GA	Glutaraldehyd
G-CSF	granulocyte-colony stimulating factor, Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GFP	green fluorescent protein, grün fluoreszierendes Protein
gp	growth plate, Wachstumsfuge
gTKG	gegabeltes trans-Kortikalgefäß

H

HSC	haematopoietic stem cell, hämatopoetische Stammzelle
HSL	Howship-Lakune
HyD	Hybrid-Detektoren

I

i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IKS	intra-kortikale Schlaufen
IL-17	Interleukin 17

IL-21	Interleukin 21
IL-22	Interleukin 22
IL-4	Interleukin 4

J

JECFA	Joint Expert FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
-------	---

K

Kat.	Kategorie
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
KK	kompakter Knochen
KM	Knochenmark
kTKG	komplexes trans-Kortikalgefäß

L

L	Liter
LA	linkes Atrium
Litt.	littermates, Geschwister-tiere
LSFM	Light-Sheet Fluorescence Microscopy, Lichtblatt Fluoreszenzmikroskopie
LV	linker Ventrikel

M

MAPK	mitogen-aktivierte Proteinkinase
M-CSF	macrophage-colony stimulating factor, Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
MEPE	extrazelluläres Matrix-Phosphoglykoprotein
mg	Milligramm
μ-CT	Mikro-Computertomographie

µl	Mikroliter
min	Minuten
ml	Milliliter
MMP 9	Matrix Metalloprotease 9
mp	Metaphyse
MRT	Magnetresonanztomogra- Phie
MSC	mesenchymal stroma cells, mesenchymale Stromazellen
mW	Milliwatt

N

NA	nutrient artery, Hauptarterie
nm	Nanometer
nm	Nanometer
NO	Stickoxide
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NTN	nephrotoxischen Serum- Nephritis

O

OPG	Osteoprotegerin
-----	-----------------

P

PBS	phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PDGFR β	platelet-derived growth fac- tor receptor, Plättchen- abstammender Rezeptor des Wachstumsfaktors β
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinostide 3-Kinase
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5- Triphosphat
pKs	Säurekonstante

PLOSL	polyzystische Lipo- membranöse Osteodyspla- sie mit sklerosierender Leu- ko- enzephalopathie
PLP	periodate lysine parafor- maldehyde, Natriumperjodat Lysin Paraformaldehyd
PMN	polymorphnukleäre neutro- phile Granulozyten
PMT	photomultiplier, Photoelektronenvervielfa- cher
PVC	perivascular cells, perivaskuläre Zellen

Q

Q	Volumenstrom
---	--------------

R

r	Radius
RA	rechtes Atrium
Rac1	Ras-bezogenes C3 Botuli- numtoxin Substrat 1
RANKL	Rezeptor-Aktivator des nu- kleären Faktor κ Liganden
RI	refraktiver Index
ROI	region of interest, definiertes Areal
rpm	rotations per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RV	rechter Ventrikel

S

s.c.	subkutan
Sema3A	Semaphorine 3A
Sema4D	Semaphorine 4D
SHG	second harmonic generati- on, Frequenzverdopplung

SLS	sodium lauryl sulfate, Natriumlaurylsulfat
SMA	smooth muscle actin, Aktin der glatten Muskulatur
SMC	smooth muscle cells, glatte Muskelzellen
STOT	specific organ toxicity, gezielte Organtoxizität

T

Tab.	Tabelle
TCCA	trichloroisocyanuric acid, Trichlorisocyanursäure
tert-But	tert-Butanol
TGF- β	transforming growth factor- β , transformierender Wachstumsfaktor- β
Th1	Typ-1-T-Helferzellen
Th2	Typ-2-T-Helferzellen
THF	Tetra-Hydrofuran
TKG	trans-Kortikalgefäß
TNF- α	Tumornekrose-Faktor- α
TPLSM	Two-Photon laser scanning microscopy, Zwei-Photonen Mikroskopie
TRAP	tartratresistente Phosphatase
Treg	regulatorische T-Zelle
TREM2	triggering receptor expressed on myeloid cells 2, auf myeloiden Zellen exprimierter stimulierender Rezeptor 2
TWEAK	TNF-like weak inducer of apoptosis, TNF-ähnlicher schwacher Apoptose Induzierer

V

v	Strömungsgeschwindigkeit
---	--------------------------

VEGF	vascular endothelial growth factor, vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
------	--

W

wf	Wachstumsfuge
WT	Wildtyp

Y

YFP	yellow fluorescent protein, gelb fluoreszierendes Protein
-----	--

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Anatomischer Aufbau von Röhrenknochen	3
Abb. 2: Signaltransduktionswege zur Osteoblastendifferenzierung	5
Abb. 3: Entwicklung von Osteoklasten, Osteoblasten, Osteozyten und Knochenoberflächenzellen	7
Abb. 4: Regulierungsmechanismen des Knochenumbaus	9
Abb. 5: Molekulare Mechanismen der Osteoklastogenese	11
Abb. 6: Mechanismen der desmalen Ossifikation	13
Abb. 7: Schematischer Verlauf der chondralen Ossifikation	14
Abb. 8: Die zellulären Mechanismen der Angiogenese und Anastomose	16
Abb. 9: Strukturelle Aspekte des Umbaus von trabekulärem und kompaktem Knochen	18
Abb. 10: Aufbau des Blutgefäßnetzwerks im Röhrenknochen	20
Abb. 11: Verschiedene Modellansätze der Blutgefäßversorgung von Röhrenknochen .	22
Abb. 12: Perfusionsschema	39
Abb. 13: Schematischer Aufbau der Mikroskopiekammer für optisch geklärte Proben .	43
Abb. 14: Aufbau der intra-vitalen Zwei-Photonen-Mikroskopie des tibialen Knochenmarks	45
Abb. 15: Schematischer Ablauf der Optimierung der optischen Durchlässigkeit mittels Ethanol und ECI	47
Abb. 16: ECI-Clearing und CD31-Färbung weicher Organe	50
Abb. 17: Spektrophotometrische Untersuchung der Transparenz verschiedener Organe	51
Abb. 18: Erhalt endogener Fluoreszenzproteine	52
Abb. 19: Langzeiterhalt endogener Fluoreszenzproteine	54
Abb. 20: Optische Eindringtiefen verschiedener Wellenlängen in Ethanol-ECI- geclearte Nieren	56
Abb. 21: Visualisierung der Endothelstrukturen in ganzen ECI-geclearten Nieren	57
Abb. 22: Vollautomatisierte Analysen der Glomeruli in gesunden und erkrankten Nieren	58
Abb. 23: ECI-Clearing verschiedener Knochentypen	60
Abb. 24: Analyse von Schrumpfungartefakten durch Gewebefixierungen und optisches Clearing	61

Abb. 25: Makroskopische Untersuchung von Röhrenknochen	62
Abb. 26: ELMI-Aufnahmen der Knochenoberfläche	63
Abb. 27: Blutgefäßfärbungen in murinen Röhrenknochen	65
Abb. 28: Aufklärung des geschlossenen Blutkreislaufs im murinen Röhrenknochen	67
Abb. 29: Quantifizierung und Charakterisierung der Gefäßtypen in der C57BL/6J Tibia.....	68
Abb. 30: Charakterisierung der TKGs.....	70
Abb. 31: Verlauf der TKGs durch den kompakten Knochen	71
Abb. 32: Nutzung der osseären Blutgefäße zur G-CSF vermittelten Zellmobilisierung .	73
Abb. 33: Querschnittsflächen der verschiedenen Gefäßtypen der C57BL/6J Tibia	75
Abb. 34: Charakterisierung der SWAP70-/- Knochenvascularisierung und Zellmobilisierung.....	77
Abb. 35: Charakterisierung der TNFtg Knochenvascularisierung und Zellmobilisierung.....	79
Abb. 36: Charakterisierung der Knochenvascularisierung bei der akuten und chronischen Arthritis	81
Abb. 37: Vaskularisation humaner Röhrenknochen.....	83
Abb. 38: Konzept des geschlossenen Blutkreislaufs im murinen Röhrenknochen	97
Abb. 39: μ CT-Aufnahmen der kortikalen Kanäle mit zunehmendem Alter.....	112
Abb. 40: Knochenumbauprozesse bei der G6PI/CFA induzierten Arthritis	114

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Chemische Strukturen und molekulare Eigenschaften gängiger Dehydrie- rungs-Reagenzien und organischer Clearing-Reagenzien.....	48
Tab. 2: Gesamtquerschnittsflächen definierter Gefäßtypen.....	75

Inhaltsverzeichnis

Publikationen während der Doktorarbeit.....	I
In Vorbereitung	I
Patente	II
Preise	II
Vorträge.....	II
Poster-Präsentationen	III
Abkürzungsverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	X
Zusammenfassung	1
Abstract	1
1 Einleitung	3
1.1 Der strukturelle Aufbau humaner Knochen	3
1.2 Differenzierung humaner Knochenzellen	4
1.3 Mechanismen des Knochenumbaus	8
1.4 Die embryonale Knochenentwicklung	13
1.5 Angiogenese von Röhrenknochen	16
1.6 Das Blutgefäßsystem des Röhrenknochens	19
1.7 Analysen des Knochens mittels bildgebender Verfahren	24
1.8 Zielsetzung	26
2 Material und Methoden	29
2.1 Materialien	29
2.1.1 Verbrauchsmaterialien.....	29
2.1.2 Geräte	30
2.1.3 Chemikalien und Puffer	31
2.1.4 Antikörper, Isotypen und zirkulierende Fluoreszenzfarbstoffe	33
2.2 Puffer/Lösungen.....	34
2.3 Rechnergestützte Auswerteprogramme.....	36
2.4 Methoden.....	36
2.4.1 Kurzzeitnarkose.....	36
2.4.2 Allgemeinnarkose	36
2.4.3 Langzeitnarkose	36
2.4.4 G-CSF Mobilisierung zur durchflusszytometrischen Analyse	37
2.4.5 Induktion der nephrotoxischen Serum-Nephritis	38
2.4.6 Induktion der rheumatischen Arthritis	38

2.4.7	Intravitale Blutgefäßfärbung und Perfusionsfixierung	39
2.4.8	Histologische Knochenschnitte	39
2.4.9	Optimierung der optischen Durchlässigkeit von weichen Geweben	40
2.4.10	Optimierung der optischen Durchlässigkeit von murinen Knochen.....	41
2.4.11	Lichtblattmikroskopie optisch geclearter Proben	42
2.4.12	Konfokale und Zwei-Photonen-Mikroskopie optisch geclearter Proben.....	43
2.4.13	Intra-vitale Zwei-Photonenmikroskopie im Knochenmark.....	44
2.4.14	Intra-vitale Zwei-Photonenmikroskopie des Periosts	46
3	Ergebnisse	47
3.1	Etablierung eines Verfahrens zu Optimierung der optischen Durchlässigkeit von murinen Organen	47
3.1.1	Identifizierung geeigneter Reagenzien zur Optimierung der optischen Durchlässigkeit	47
3.1.2	Anwendung des Ethanol-ECi-Verfahrens bei weichen Organen in Kombination mit Antikörperfärbungen	49
3.1.3	Charakterisierung des Ethanol-ECi-Verfahrens zur Optimierung der optischen Durchlässigkeit	50
3.1.4	Langzeitstabilität endogener Fluoreszenzproteine	52
3.1.5	Optische Eindringtiefen verschiedener Wellenlängen in Ethanol-ECi- geclearte Nieren	55
3.1.6	Anwendung des Ethanol-ECi-Verfahrens zur Analyse der NTN- vermittelten Glomerulonephritis in murinen Nieren.....	56
3.1.7	Anwendung des Ethanol-ECi-Verfahrens bei harten Organen	59
3.1.8	Analyse der Gewebeschrumpfung durch das Ethanol-ECi-Verfahren	60
3.2	Analyse des Blutgefäßsystems in murinen Röhrenknochen	62
3.2.1	Analyse von Blutgefäßstrukturen auf der Knochenoberfläche	62
3.2.2	Visualisierung mit der Tibia assoziierter Blutgefäße	64
3.2.3	Identifizierung und Charakterisierung von Gefäßtypen in der Tibia	66
3.2.4	Charakterisierung der trans-Kortikalgefäße in der C57BL/6J Tibia.....	69
3.2.5	Nutzung der osseären Vaskularisation zur Zellmobilisierung	72
3.3	Einfluss osseärer Erkrankungen auf die Vaskularisation muriner Röhrenknochen.....	76
3.3.1	Einfluss der Osteopetrose auf die Knochenvaskularisation	76
3.3.2	Einfluss der Osteoporose auf die Knochenvaskularisation	78
3.3.3	Einfluss der akuten und chronischen Arthritis auf die Knochenvaskularisation.....	80
3.4	Die Vaskularisation humaner Röhrenknochen.....	82
4	Diskussion.....	84
4.1	Potentielle Anpassungen des Ethanol-ECi basierten Verfahrens zur Optimierung der optischen Durchlässigkeit und des Fluoreszenzerhalts	84

4.2	Anwendung des etablierten Ethanol-ECi Verfahrens zur Optimierung der optischen Durchlässigkeit an weichen Organen	89
4.3	Aufklärung des Blutgefäßsystems in murinen Röhrenknochen.....	92
4.3.1	Anwendung der Elektronenmikroskopie zur Visualisierung der Knochenoberfläche.....	92
4.3.2	Anwendung des ECi-Ethanol Verfahrens an murinen Knochen	94
4.3.3	Identifikation des Blutgefäßsystems in der murinen Tibia.....	95
4.3.4	Analyse der osseären Vaskularisation verschiedener Krankheitsmodelle	101
4.3.5	Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark in die generelle Blutzirkulation bei verschiedenen Krankheitsmodellen	105
4.4	Die Vaskularisation humaner Röhrenknochen	107
5	Ausblick.....	111
5.1	Alterungsprozesse im Röhrenknochen	111
5.2	Spornausbildung in der rheumatoiden Arthritis	113
6	Literaturverzeichnis	116
7	Anhang.....	130
7.1	Videomaterial und Datenblätter	130
7.2	Danksagungen.....	132
7.3	Kooperationen im Rahmen der Dissertation	133
7.3.1	Optical-projection tomography (OPT) geclearter Röhrenknochen	133
7.3.2	Elektronenmikroskopische (ELMI) Aufnahmen von Röhrenknochen.....	133
7.3.3	Induktion der nephrotoxischen Serum-Nephritis	133
7.3.4	Induktion der rheumatoiden Arthritis	133
7.3.5	Analysen osteopetrotischer Knochen anhand des SWAP70 ^{-/-} -Mausmodells	133
7.3.6	Analysen osteoporotischer Knochen anhand des hTNFtg-Mausmodells .	134
7.3.7	7Tesla-Magnetresonanztomographie (7T-MRT) Daten	134
7.4	Lebenslauf	135
7.5	Eidesstattliche Erklärungen	139

Zusammenfassung

Knochen stellen ein hoch spezialisiertes Gewebe dar, welches die muskelvermittelte Fortbewegung des Lebewesens ermöglicht, dem Schutz von weichen Organen dient, eine Nische für immunologische Zellen bildet, so wie die Homöostase und den Metabolismus reguliert. Darüber hinaus erfolgt in ihrem Knochenmark ausgehend von hämatopoetischen Stammzellen, die in so genannten Knochenmarksnischen lokalisiert sind, die Hämatopoese, die Bildung von Blut- und Immunzellen. Da diese Nischen bisher lediglich eindeutig in Röhrenknochen nachgewiesen wurden, könnte ein funktioneller Unterschied zwischen Röhrenknochen und flachen Knochen vorliegen. Um die Mechanismen zu analysieren, die der Bildung, Interaktion und Rekrutierung von Immunzellen zu Grunde liegen, fokussiert sich diese Doktorarbeit daher ausschließlich auf Röhrenknochen.

Interessanterweise lagen zu Beginn dieser Doktorarbeit keine umfassenden und einheitlichen Modelle zum Blutgefäßsystem und dem geschlossenen Blutkreislauf in Röhrenknochen vor. Das Verständnis des geschlossenen Blutkreislaufs im Röhrenknochen ist aber essentiell, um die generelle Knochenbiologie sowie diverse immunologische Mechanismen, wie die Mobilisierung von Immunzellen aus dem Knochenmark in die Peripherie, zu begreifen. Zur Aufklärung des geschlossenen Blutkreislaufs im Röhrenknochen wurde daher im Rahmen dieser Doktorarbeit ein Verfahren zur Optimierung der optischen Durchlässigkeit entwickelt und patentiert, das auf einer Gewebedehydrierung mittels Ethanol und der Anpassung des refraktiven Indexes mittels Zimtsäureethylester (engl.: ethyl cinnamate, ECi) basiert. Dieses Verfahren ermöglichte die Visualisierung und Analyse von fluoreszent markierten Strukturen in ganzen Organen, weshalb ein zusätzliches Verfahren zur antikörperbasierten Färbung und Identifizierung von Endothelstrukturen etabliert wurde.

Diese Methoden wurden zunächst an weichen Organen getestet und etabliert, wobei sich die Niere aufgrund ihrer starken Vaskularisation als besonders geeignet ergab. Folglich wurden das Ethanol-ECi-Verfahren und die Antikörperfärbungen zur Visualisierung von Endothelschädigungen, die durch eine nephrotoxische Nephritis induziert wurden, in ganzen Nieren mittels der Lichtblatt-Fluoreszenzmikroskopie genutzt. In Kombination mit einem neu entwickelten Algorithmus konnten die entsprechenden Strukturen voll automatisiert quantifiziert werden, wobei die so generierten Daten im Rahmen einer separaten Studie publiziert wurden.

Das Ethanol-ECi-Verfahren wurde darauf folgend dazu genutzt, um Knochen in ihrer Gesamtheit untersuchen zu können, wozu die Lichtblatt-Fluoreszenzmikroskopie und für hochauflösende Detailaufnahmen die konfokale Laserrastermikroskopie sowie die Zwei-Photonen Laserrastermikroskopie verwendet wurden.

Die entsprechenden Analysen ermöglichten die erstmalige Aufklärung des geschlossenen Blutkreislaufs im murinen Röhrenknochen unter Berücksichtigung der Vaskularisation des kompakten Knochens. Überraschenderweise wurden dabei Blutgefäße identifiziert, die zuvor nicht in der Literatur beschrieben wurden. Diese verbinden die Vaskularisation des Knochenmarks durch den kompakten Knochen hindurch mit dem periostalen Gefäßnetzwerk, weshalb sie als trans-Kortikalgefäße (TKGs) bezeichnet wurden. Das entsprechende Gefäßsystem des kompakten Knochens wurde darüber hinaus bei verschiedenen knochenverändernden Erkrankungen wie der Osteoporose, der Osteopetrose und der rheumatoiden Arthritis untersucht. Hinsichtlich der Osteoporose und der Osteopetrose ergaben sich hoch signifikante Veränderungen der TKGs die mit der Knochendicke korrelierten. So wiesen die osteoporotischen Knochen mit einer geringen Knochendicke weniger Gefäße als die Kontrolltiere auf, während bei den osteopetrotischen Knochen mit einer erhöhten Knochendichte mehr Gefäße vorlagen. Und auch bei der rheumatoiden Arthritis zeigte sich über den chronischen Verlauf der Krankheit hinweg eine stete Zunahme der TKGs, die in der nahezu dreifachen Gefäßanzahl im Vergleich zu den Ausgangswerten resultierte.

Da mittels intravitaler Zwei-Photonen Laserrastermikroskopie gezeigt werden konnte, dass die TKGs zur Auswanderung von Immunzellen aus dem Knochenmark genutzt werden können, wurde mittels durchflusszytometrischer Analysen die Rekrutierung von Immunzellen, am Beispiel der G-CSF vermittelten Mobilisierung von neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark in die generelle Blutzirkulation, untersucht. Entsprechend der Gefäßanzahlen im kompakten Knochen waren unterschiedlich starke Rekrutierungen nachzuweisen. Die erhöhte Zell-Rekrutierung bei hoher TKG-Anzahl und die niedrigere Rekrutierung bei geringer TKG-Anzahl lassen daher auf eine Korrelation der Gefäßanzahl und der Effektivität der Zellauswanderung aus dem Knochenmark schließen.

Neben den Analysen des murinen Systems wurden auch humane Knochen mittels fotografischer und 7-Tesla magnetresonanzmikroskopischer Aufnahmen untersucht. Dabei ließen sich Strukturen nachweisen, die starke Homologien zu den Blutgefäßen der murinen Röhrenknochen aufwiesen.

Insgesamt wurde durch die Etablierung eines Verfahrens zur Visualisierung und Analyse ganzer Knochen, so wie durch die Aufklärung des geschlossenen Blutkreislaufs im Röhrenknochen die Grundlage für umfassende Studien zu knochenassoziierten Fragestellungen ermöglicht. Neben der Aufklärung der strukturellen Gefäßorganisation können nun auch funktionelle Aspekte des Knochenmarks, Knochenerkrankungen sowie immunologische Mechanismen in diesem bisher nur schwer zugänglichen Organ untersucht werden.

Abstract

Bones represent a highly specialized tissue, which permits the movement and locomotion, protects the internal organs, forms a reservoir for immunologic cells, and regulates the homeostasis and metabolism. Furthermore, the hematopoiesis takes place within distinct stem cell niches in the bone marrow, where blood cells and immune cells are generated. Interestingly, so far these niches have only been clearly identified in long bones but not in flat bones, hinting at functional differences between these two types of bones. Therefore, this thesis is focusing on murine long bones for analyzing the mechanisms of immune cell formation, interactions and recruitment.

At the beginning of this project, only contrary concepts of the bone vascularization and the blood circulation in long bones were existing. Certainly, the knowledge about the blood circulation in long bones is essential for understanding general aspects of bone biology as well as complex immunologic mechanisms. For example, the process of immune cell mobilization from the bone marrow to peripheral sites cannot be explained without this knowledge. To identify the fully circulatory system of long bones, a method for optical clearing of soft and hard organs, based on tissue dehydration via Ethanol and the refractive index matching via Ethyl cinnamate (ECi) was established, published and patented within this thesis. This method allowed the visualization and analysis of fluorescently labeled structures in whole organs. Therefore, an additional approach for *in vivo* labeling of endothelial structures was established.

First, these methods were tested and established on soft organs, whereupon kidneys were extremely suitable as they are highly vascularized. Thus the Ethanol-ECi-method and the antibody-labeling of endothelial structures were used for visualizing endothelial damage in whole kidneys induced via nephrotoxic nephritis. For whole organ imaging, a light sheet fluorescence microscope (LSFM) was used, which allows imaging of samples up to two centimeters size. In combination with a newly generated algorithm, this method facilitated a fully automated quantification and characterization of glomerular tufts in whole kidneys. The regarding results were published in a separated study.

Subsequently, the LSFM was used to analyze ECi-cleared long bones and two-photon laser scanning microscopy (TPLSM) was used for high resolution imaging. Based on the generated data, a closed vascular system in long bones was identified

for the first time. Surprisingly, a completely new type of vessels, running through the compact bone connecting the endosteal vessels with the periosteal vessel network, could be visualized. Therefore, these newly identified structures were named trans-cortical vessels (TCVs).

In addition to the identification and characterization of a closed vessel network, the effects of changes on bone formation to these structures were analyzed. Osteoporosis, a model for bone loss, and osteopetrosis, a model for increased bone mass, were investigated. Furthermore, the effects of acute and chronic rheumatoid arthritis on long bones were studied. The osteoporotic bones as well as the osteopetrotic bones showed highly significant changes in TCV numbers and their structure, which correlated with the bone mass. Thus, a lower bone mass was associated with decreased TCV numbers, while increased bone mass showed increased TCV numbers compared to healthy bones. In case of the rheumatoid arthritis, a constant increase in TCV numbers was observed during pathogenesis.

Furthermore, it was shown by intravital TPLSM, that the TCVs can be used for cell recruitment from the bone marrow to peripheral sites. Accordingly, the cell recruitment after stimulation via the granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) was analyzed by flow cytometric measurements. Interestingly, the percentages of recruited neutrophil granulocytes correlated with the TCV numbers at defined time points. In case of high TCV, numbers more cells were recruited compared to healthy control, while reduced TCV numbers resulted in reduced cell recruitment. This might hint at a correlation between the vessel architecture of long bones and cell recruitment effectiveness.

Beside the analysis of murine long bones, also human bones were analyzed by photography and 7Tesla magnetic resonance tomography imaging. Various structures were observed, which showed high homology to the murine structures.

The establishment of a new method for the visualization and analysis of whole bones as well as the identification of a closed vascular system in murine long bones provide a basis for a broad range of bone associated studies. In addition to the structural aspects of vessel organization, also functional aspects of the bone marrow, bone associated diseases and immunologic mechanisms can now be studied in this, so far, hardly accessible organ.

1 Einleitung

1.1 Der strukturelle Aufbau humaner Knochen

Das Skelett der Vertebraten stellt ein endokrines und mechanisches Organ dar, welches die muskelvermittelte Fortbewegung des Lebewesens ermöglicht, dem Schutz von weichen Organen dient, eine Nische für immunologische Zellen liefert, so wie die Homöostase und den Metabolismus reguliert. So werden Blutzellen, inklusive Immunzellen, primär im roten Knochenmark, das im Knocheninneren lokalisiert ist, gebildet. Indem Knochen das Hauptreservoir für Kalzium und Phosphate im Körper darstellen, regulieren sie maßgeblich den Elektrolyt- und auch den Säure-Basen-Haushalt des Organismus^{1,2}.

Grundsätzlich verfügen Knochen über eine harte äußere Schale, die als kompakter Knochen bezeichnet wird und oftmals ein trabekuläres Knochensystem, die Spongiosa, ummantelt. Die charakteristische Härte des kompakten Knochens beruht auf der spezifischen Gewebezusammensetzung, die zu 20-40 % eine Protein-reiche organische Matrix sowie zu 40-70 % eine kristalline anorganische Matrix umfasst und 5-10 % Wasser <3 % Lipide beinhaltet. Während die Proteine der organischen Matrix zu 85-90 % aus kollagenen Proteinen, primär Typ I Kollagen bestehen, stellt Hydroxylapatit den Hauptbestandteil der anorganischen Matrix dar. Die Kombination der mineralisierten Nanokristalle mit der weicheren organischen Matrix gewährleistet neben der Festigkeit auch die benötigte Flexibilität der Knochen, die eine Deformierung bei mechanischer Belastung und Wiederherstellung der Ursprungsmorphologie nach Beendigung der Belastung ermöglicht³⁻¹⁰.

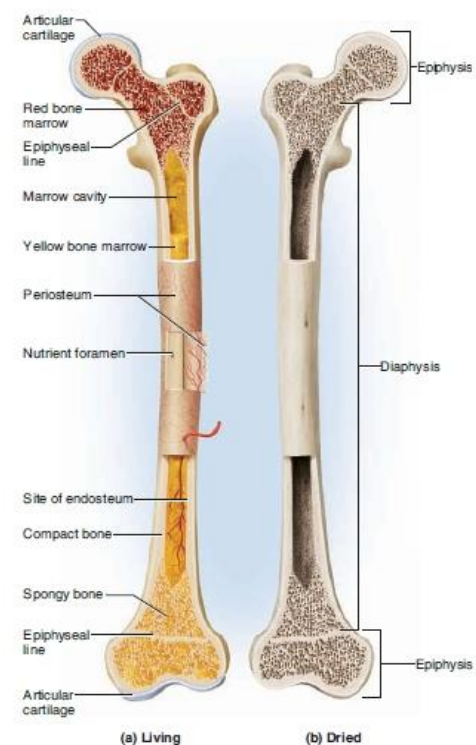


Abb. 1: Anatomischer Aufbau von Röhrenknochen

(a) Der Femur enthält weiches Gewebe in Form von rotem und gelbem Knochenmark, Blutgefäßen und Knorpelgewebe. Den harten Gewebeanteil bilden die Kompakta und die Spongiosa. (b) Röhrenknochen können generell in Epiphyse und Diaphyse unterteilt werden.²

Strukturell kann zwischen flachen Knochen, wie der Calvaria und den Schulterblättern, irregulären Knochen, wie dem Becken und den Wirbelknochen, kurzen Kno-

chen, wie den Gelenkknochen, und Röhrenknochen, die beispielsweise die Elle und Speiche umfassen, unterschieden werden. Röhrenknochen, die primär die Knochen der Extremitäten darstellen, können in einen zylindrischen Knochenschaft, die Diaphyse, und verdickte Knochenenden, die Epiphysen unterteilt werden (Abbildung 1). Während der kompakte Knochen der Diaphyse die so genannte Knochenmarkshöhle umschließt, beinhalten die Epiphysen primär spongiösen Knochen. Oberflächlich ist der Knochen von dem Periost, der stark durchbluteten Knochenhaut, umgeben. Dieses besteht aus einer äußeren Kollagen-haltigen fibrösen Schicht, die die Verbindung der Muskulatur mit dem Knochen über Sehnen gewährleistet und einer inneren Osteoblasten-haltigen Schicht, dem Kambium. Die osteogene Aktivität des Kambiums spielt eine zentrale Rolle bei den Heilungsprozessen nach Knochenbrüchen und dem apositionellen Knochenwachstum, was in zunehmenden Knochendurchmessern bei steigendem Alter resultiert. Auf der Innenseite des kompakten Knochens befindet sich das Endost, das eine höhere osteogene Aktivität als das Periost aufweist, was durch eine stärkere biomechanische Belastung oder eine verstärkte Zytokin-Aktivierung durch das angrenzende Knochenmark bedingt sein kann. Am Endost erfolgt verstärkt der Knochenabbau, was in einer größer werdenden Knochenmarkshöhle bei steigendem Alter resultiert ^{2,5,11,12}.

1.2 Differenzierung humaner Knochenzellen

Der von der Embryogenese bis zum Tod permanent ablaufende Umbau des Knochengewebes dient der Knochenheilung bei Frakturen, der skelettalen Anpassung an mechanische Beanspruchungen, so wie der Aufrechterhaltung der Phosphat- und Kalzium-Homöostase des Körpers ¹³. Die entsprechenden Auf- und Abbauprozesse während des Knochenumbaus sind dabei durch diverse Zelltypen, wie Osteoklasten, Osteoblasten und Osteozyten, mit spezifischen Funktionen und Mechanismen reguliert.

Die mesenchymalen Stammzellen, die auch als mesenchymale Stromazellen (engl.: mesenchymal stromal cells, MSCs) bezeichnet werden, sind sowohl im Endost als auch im Kambium des Periosts lokalisiert. Sie weisen eine sehr hohe und konstante Teilungsrate auf und bilden die Osteoblasten-Vorläuferzellen, die sich über Prä-Osteoblasten zu Osteoblasten ausdifferenzieren. Diese Differenzierung ist sehr komplex und umfasst zahlreiche Signaltransduktionswege.

Unter anderem ist sie von der Synthese des Knochen-Morphogenese-Proteins (engl.: bone morphogenetic protein, BMP), das ein multifunktionales Zytokin der transformierenden Wachstumsfaktor- β -Familie (engl.: transforming growth factor- β , TGF- β) darstellt, abhängig. Die hoch konservierte, β -Catenin-abhängige (kanonische) TGF- β /BMP Signalkaskade umfasst dabei TGF- β /BMP-Liganden, zwei verschiedene Typen von zelloberflächenexprimierten BMP-Rezeptoren (BMPR), sowie Proteine, die extrazelluläre Signale zum Nukleus weiterleiten, so genannte Smads. Die für den BMP-Signalweg spezifischen Smads interagieren mit diversen Proteinen wie RUNX2, das zu der Familie der Runt-Domänen Proteine gehört, die wiederum Faktoren zur Knochenzelldifferenzierung induzieren können.

Umgekehrt können aber auch nicht-kanonische, Smad-unabhängige Signalwege, die über p38 mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) erfolgen, die Runx2-abhängige Genexpression zur Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen regulieren. Darüber hinaus spielt Runx2 in

weiteren Signalwegen zur Differenzierung von Osteoblasten, wie Wnt-, Hedgehog-, Notch- und diversen MAPK-Signalwegen, eine zentrale Rolle (Abbildung 2). Da ausdifferenzierte Osteoblasten selber über keine mitotische Aktivität verfügen, können sie ausschließlich aus den Osteoblasten-Vorläuferzellen gebildet werden¹⁴⁻¹⁹.

Die Hauptfunktion der Osteoblasten besteht in der Generierung von neuer organischer Knochenmatrix anhand der Sekretion von Typ I Kollagen und nichtkollagenen Proteinen, so wie der Mineralisierung des Gewebes. Im Rahmen von Knochenum-

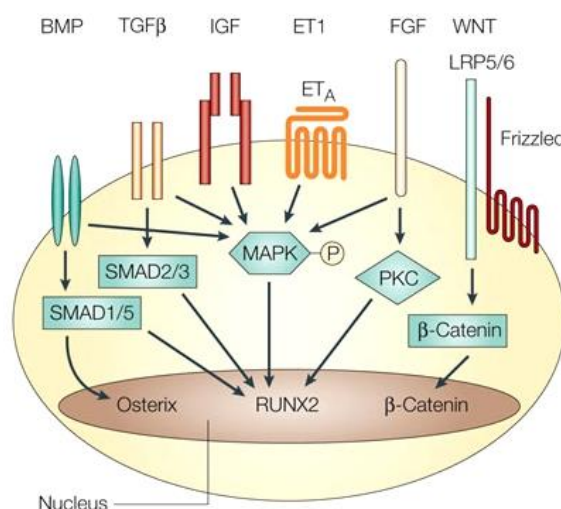


Abb. 2: Signaltransduktionswege zur Osteoblastendifferenzierung

Die Bindung von Knochen-Morphogenese-Proteinen (engl.: bone morphogenetic proteins, BMPs) an ihren Rezeptor (grün) induziert die Formation eines Komplexes, in dem Typ II BMPRs phosphoryliert und Typ I BMPRs aktiviert werden. Der Typ I BMPR induziert die Phosphorylierung der Smad 1 und Smad 5 Proteine, die daraufhin RUNX2 und Osterix hochregulieren. BMP2 aktiviert auch die p38 mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK), die wiederum die RUNX2-Transkription erhöht. Ebenso reguliert TGF- β (gelb) die RUNX2-Transkription durch die Aktivierung von Smad2, Smad3 und MAPK. Die Fibroblasten Wachstumsfaktoren (engl.: fibroblast growth factors, FGFs, hellgelb), die Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren (IGFs, hellrot) und Endothelin-1 (ET-1, orange) aktivieren alle die MAPK, die wiederum RUNX2 und Osterix aktiviert. FGF aktiviert darüber hinaus mittels Dimerisierung und Autophosphorylierung der FGFRs die Proteinkinase C (PKC), die die Transkription von RUNX2 hochreguliert. Sowohl die Aktivierung von RUNX2 als auch von Osterix führt zu einer erhöhten Expression von Osteoblasten-spezifischen Genen, wie Osteocalcin und alkalinen Phosphatasen, was in einer erhöhten Knochenbildung resultiert. Die Wnt-Proteine hingegen interagieren mit dem Rezeptor „frizzled“ (rot) und den Co-Rezeptoren LRP5 und LRP6 (hellgrün). Diese aktivieren zytoplasmatische β -Catenin-Stoffwechselwege, die bisher nicht definierte Gene, die die Knochenbildung unterstützen, regulieren.¹⁸

bauprozessen können Osteoblasten in die neu gebildete Knochenmatrix eingebettet werden und dort zu Osteozyten differenzieren. Diese ausschließlich in Lakunen der mineralisierten Knochenmatrix lokalisierten Zellen stellen rund 90 % aller im kompakten Knochen befindlichen Zellen dar. Die Differenzierung der Osteoblasten zu Osteozyten geht mit einer morphologischen Änderung zu einem dendritischen Phänotyp einher. Die Mechanismen der Umwandlung von Osteoblasten zu Osteozyten sind jedoch noch nicht vollständig geklärt. Unter anderem scheint aber das Dentin Matrixprotein 1 (DMP-1) ein Schlüsselmolekül in der Regulierung der Osteozytenbildung zu sein. Auch konnten veränderte zytoplasmatische Prozesse bei der Osteozytendifferenzierung nachgewiesen werden. So wird das Protein Podoplanin stark in frisch eingebetteten Osteozyten exprimiert, wodurch diese Ähnlichkeiten zum Expressionsprofil dendritischer Zellen, wie Podozyten oder Zellen des Plexus choroideus, aufweisen. In ausgereiften Osteozyten hingegen wird verstärkt Sklerostin exprimiert, das LRP5 im Wnt-Signalweg antagonisiert und somit die Osteoblastendifferenzierung inhibiert. Weitere charakteristische Proteine für ausgereifte Osteozyten stellen die Gruppe der extrazellulären Matrix-Phosphoglykoproteine (MEPE) und der Fibroblasten Wachstumsfaktor 23 (FGF 23) dar. Diese spielen eine zentrale Rolle bei der Regulierung des Phosphat- und Kalzium-Metabolismus des kompakten Knochens. Über die dendritischen Fortsätze, die in kleinen Knochenkanälen, den Kanalikuli, verlaufen, sind die Osteozyten über Zell-Zell-Kanäle (engl.: gap junctions) miteinander verbunden. Über diese Verbindungen können sie Nährstoffe und biochemische Signale aneinander und an Osteoblasten auf der Knochenoberfläche weitergeben²⁰⁻²⁴.

Osteoblasten können neben ihrer Differenzierung zu Osteozyten im Laufe der Knochenumwandlung auch absterben oder abflachen und inaktiviert werden. Diese inaktiven Zellen werden als Knochenoberflächenzellen oder als Lining-Zellen bezeichnet und bedecken bezüglich der Umbauprozesse inaktive Areale der Knochenoberfläche. Die Funktion dieser Knochenoberflächenzellen ist nicht vollständig geklärt, aber es konnte gezeigt werden, dass sie die direkte Interaktion von Osteoklasten mit der Knochenmatrix in Arealen, wo keine Knochenresorption erfolgen soll, inhibieren können und somit eine Barriere-Funktion erfüllen. Des Weiteren spielen sie eine Rolle bei der Osteoklastendifferenzierung, indem sie Osteoprotegerin (OPG) und den Rezeptor-Aktivator des nukleären Faktor κ B Liganden (RANKL) exprimieren^{2,5,12-14,21,25,26}.

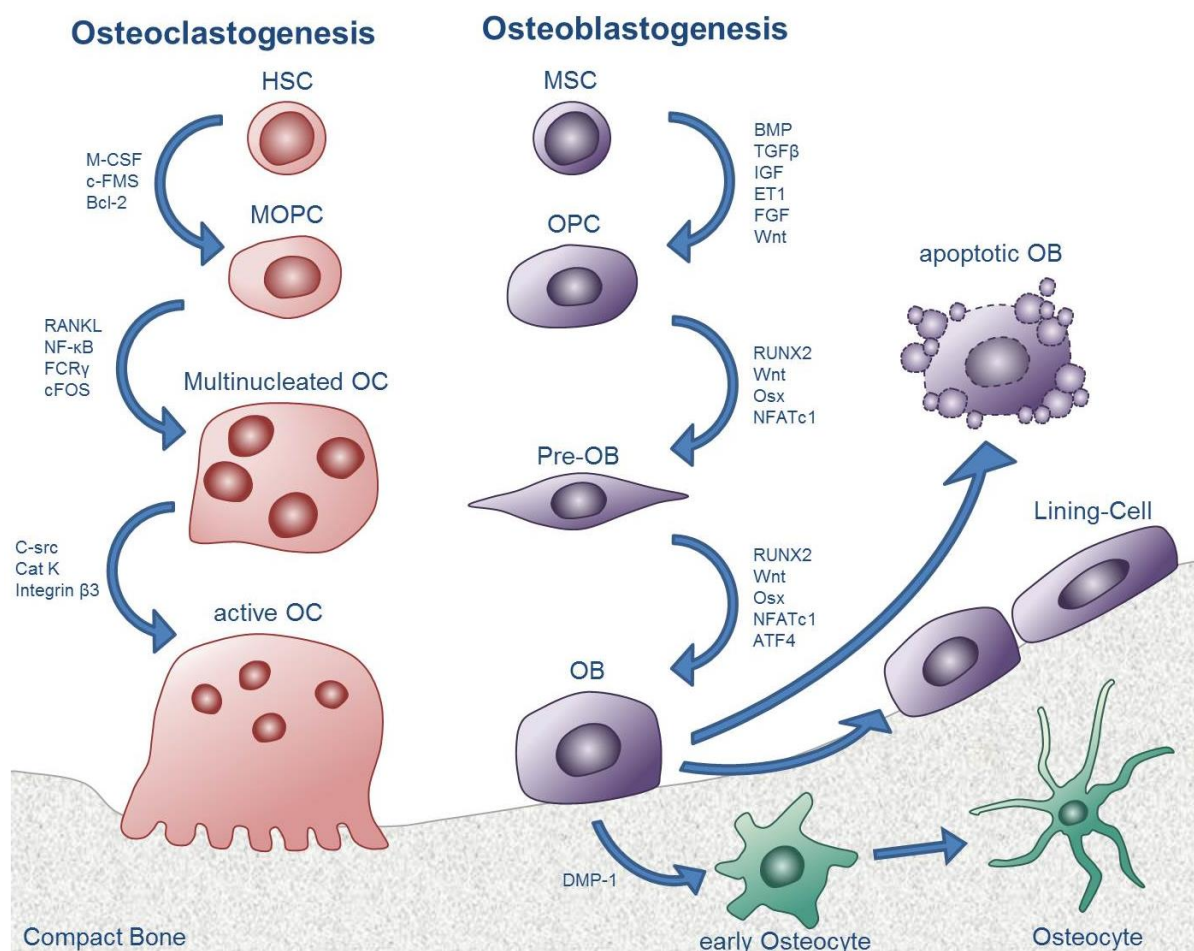


Abb. 3: Entwicklung von Osteoklasten, Osteoblasten, Osteozyten und Knochenoberflächenzellen

Hämatopoetische Stammzellen (HSC, rot) differenzieren aufgrund diverser Stimuli, wie M-CSF, c-FMS oder Bcl-2 zu myeloiden Osteoklasten-Vorläuferzellen (engl.: myeloid osteoclast precursor cells, MOPC). Durch Faktoren wie RANKL, NF-κB, FcγR oder cFOS fusionieren mehrere MOPCs zu einem multinukleären Osteoklasten. Die Reifung zu einem aktiven Osteoklasten erfolgt unter anderem über Faktoren wie C-scr, Cat-K oder Integrin β3. Im Gegensatz zu den Osteoklasten gehen Osteoblasten aus mesenchymalen Stromazellen (MSC, lila) hervor. Über diverse Signaltransduktionswege wie BMP, TGFβ, IGF, FGF oder Wnt differenzieren sich die MSCs zu Osteoblasten-Vorläuferzellen (engl.: Osteoblast precursor cells, OPC). Über RUNX2, Wnt, Osterix (Osx) oder NFATc1 vermittelte Signalwege erfolgt die weitere Differenzierung zu Präosteoblasten (Pre-OB) und schließlich zu ausgereiften Osteoblasten (OB). Im Laufe der Knochenumwandlungsprozesse können OBs absterben (apoptotic OB), oder sich zu inaktiven Osteoblasten, den Knochenoberflächenzellen (Lining-Cells), umwandeln. Die Differenzierung von OBs zu Osteozyten, die bei der Knochenneubildung in den kompakten Knochen (engl.: compact bone, grau) eingebettet werden, basiert auf bisher unbekannten Faktoren. Die Abbildung basiert auf ^{18,21,24,26}

Osteoklasten sind knochenabbauende Zellen, die auf der Oberfläche des kompakten Knochens, sowohl am Periost als auch am Endost, lokalisiert sind. Sie werden von mononukleären Zellen der hämatopoetischen Stammzelllinie (engl.: haematopoietic stem cells, HSCs) gebildet, wobei mehrere Zellen zu einem Osteoklasten fusionieren. Daher können diese Zellen mit bis zu 150 µm Durchmesser im humanen System ungewöhnlich groß werden und verfügen über mehrere Zellkerne. Die Differenzierung der Osteoklasten ist durch diverse Faktoren reguliert. So können mesenchymale Osteoblasten-Vorläuferzellen und Osteoblasten den Makrophagen Koloniestimulierenden Faktor (engl.: macrophage colony-stimulating factor, M-CSF) sekretieren, der an seinen auf Osteoklasten-Vorläuferzellen exprimierten Rezeptor (cFMS)

bindet und deren Proliferation stimuliert. Auch RANKL, der von Osteoblasten, Osteozyten und Stromazellen sekretiert wird, spielt eine zentrale Rolle bei der Osteoklastogenese. Die RANKL-vermittelte Osteoklastenbildung kann jedoch durch Faktoren wie OPG, das neben Osteozyten auch von Osteoblasten, Stromazellen und diversen Fibroblastentypen gebildet wird, inhibiert werden^{2,5,12-14,21,25,26}.

Die intakte Regulierung der aktivierenden und inhibierenden systemischen und lokalen Faktoren ist essentiell um das Gleichgewicht der Knochenaufbau- und Knochenabbauprozesse zu gewährleisten.

1.3 Mechanismen des Knochenumbaus

Die konstanten Umbauprozesse des Knochens unterliegen einer Vielzahl von regulatorischen Mechanismen, wobei gezielt die Aktivitäten der knochenaufbauenden Osteoblasten und der knochenabbauenden Osteoklasten koordiniert werden.

Durch die Bindung von RANKL an den RANK-Rezeptor werden die Osteoklasten-Vorläuferzellen aktiviert und bilden ihr Zytoskelett um, wobei zwei hoch spezialisierte Membrantypen entstehen. Zum einen wird eine glatte Zelloberfläche ausgebildet und zum anderen eine geriffelte Membran, die direkt mit dem kompakten Knochen verbunden ist (Abbildung 4).

Über $\alpha_v\beta_3$ Integrine bilden die Osteoklasten eine feste Verbindung mit dem kompakten Knochen aus. Die geriffelte Osteoklastenmembran ist von einer F-Aktinreichen Struktur umgeben, die als Aktinring oder Versiegelungszone bezeichnet wird. Diese separiert die Resorptionslakune, die so genannte Howship-Lakune (HSL), von dem umgebenden extrazellulären Raum und bildet ein abgeschlossenes Areal aus. Dort erfolgt die Zersetzung des Hydroxylapatits durch die Ansäuerung der Knochenmatrix. Durch die Spaltung von Kohlensäure durch die Carbonanhydrase II (CA II) werden Wasserstoffionen (H^+) gebildet, die mittels einer H^+ -ATPase Protonenpumpe über die geriffelte Membran in die HSL transportiert werden. Des Weiteren werden über einen Chlorid-Bikarbonat-Austauscher Chloridionen in den Osteoklasten aufgenommen und über Chloridkanäle in die HLS freigesetzt. In Reaktion der Chloridionen mit den H^+ bildet sich Salzsäure, wodurch der pH in der HLS auf 3 bis 4 sinkt und das Hydroxylapatit der Knochenmatrix zersetzt wird. Nach der Auflösung der mineralischen Knochenbestandteile setzen die Osteoklasten die Endoprotease Cathepsin K, die Matrix Metalloprotease-9 und die saure

tartratresistente Phosphatase zum Abbau der organischen Matrix frei. Der Knochenaufbau über Osteoblasten hingegen erfolgt durch die Sezernierung von Kollagen I und nicht kollagenen Proteinen wie Osteocalcin, Osteopontin, Osteonectin, Knochen-Sialprotein und BMP, die die Mineralisierung des Knochens stimulieren^{13,27-32}.

Die in dem kompakten Knochen lokalisierten Osteozyten können durch die Freisetzung von RANKL und M-CSF die Osteoklastogenese aktivieren. Darüber hinaus können sie durch die Sezernierung von Prostaglandin E₂, Stickoxiden (NO) und IGF die Osteoblastogenese aktivieren und somit den Knochenumbau regulieren. Osteoklasten und Osteoblasten können sich aber auch über weitere Mechanismen

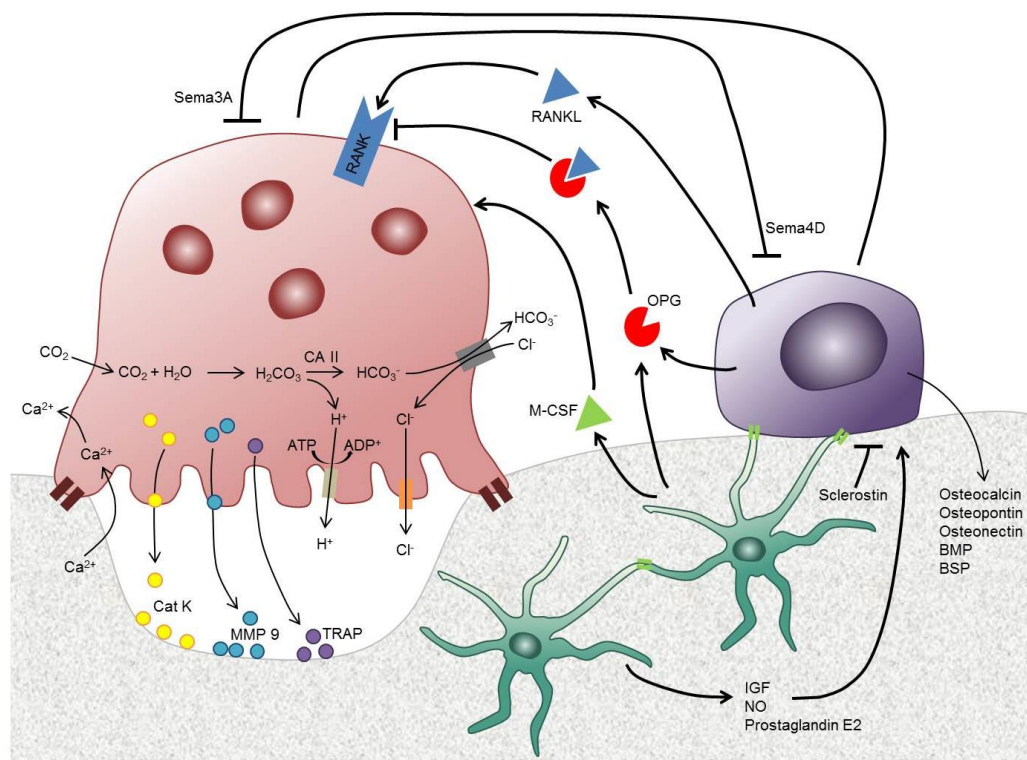


Abb. 4: Regulationsmechanismen des Knochenumbaus

Übersichtsdarstellung der chemischen Knochenumbauprozesse (dünne schwarze Pfeile) und ihrer Regulationsmechanismen (dicke schwarze Pfeile). Osteoklasten (rot), die über $\alpha_v\beta_3$ Integrine (dunkelrote Streifen) mit dem kompakten Knochen verbunden sind, spalten mittels der Carbonanhydrase II (CA II) Kohlensäure (H_2CO_3) in Bikarbonat (HCO_3^-) und Wasserstoffionen (H^+). Mittels einer Protonenpumpe (beiges Rechteck) werden die H^+ über die geriffelte Membran der Osteoklasten in den Zwischenraum zum kompakten Knochen, die Howship-Lakune (HSL), transportiert. Über einen Chlorid-Bikarbonat-Tauscher (graues Rechteck) werden HCO_3^- Ionen aus den Osteoklasten aus- und Chloridionen (Cl^-) eingeschleust. Über Chloridkanäle (oranges Rechteck) gelangen die Cl^- in die HLS, wo sie mit den H^+ Salzsäure (HCl) bilden und durch die entsprechende pH-Absenkung das im kompakten Knochen enthaltene Hydroxylapatit zersetzen. Durch die Freisetzung von Cathepsin K (Cat K), der Matrix Metalloprotease-9 (MMP 9) und der sauren tartratresistenten Phosphatase (TRAP) wird die organische Phase der Knochenmatrix abgebaut. Der Knochenaufbau hingegen erfolgt über die Osteoblasten (lila), die Kollagen I und diverse nicht kollagene Proteine wie Osteocalcin, Osteopontin, Osteonectin, Knochen-Sialprotein (BSP) und Knochen-Morphogenese-Proteine (BMP) zur Mineralisierung des Knochens freisetzen. Die Auf- und Abbauprozesse werden über diverse Faktoren reguliert. So regulieren die Osteozyten (grün), die über Zell-Zell Kanäle (endl.: gap-junctions) interagieren (hellgrüne Streifen), durch die Sezernierung von IGF, Stickoxiden (NO), Prostaglandin E₂ und Sklerostin die Differenzierung der Osteoblasten. Durch die Bildung von RANKL und M-CSF können sie Osteoklasten aktivieren und durch die Bildung von Osteoprotegerin (OPG) inhibieren. Diese regulierenden Faktoren können ebenfalls von Osteoblasten zur Osteoklastenregulierung sezerniert werden. Über die Semaphorine 4D (Sema4D) und 3A (Sema3A) können sich Osteoblasten und Osteoklasten direkt gegenseitig in ihrer Aktivität inhibieren. Die Abbildung basiert auf^{28,29,30}

gegenseitig regulieren. So bindet das Ephrin-B2 (Eph2), das in der Osteoklastenmembran lokalisiert ist, über EphrinB4 (Eph4) an Osteoblasten und induziert deren Differenzierung. Hingegen inhibiert die umgekehrte Bindung von Eph4 an Eph2 die Osteoklastogenese. Und auch das von Osteoklasten gebildete Semaphorin-4D (Sema4D) inhibiert Osteoblasten, während das von Osteoblasten gebildete Sema3A inhibitorische Effekte auf Osteoklasten hat. Des Weiteren generieren Osteoblasten RANKL und OPG, die die Osteoklastogenese aktivieren oder inhibieren können^{13,27-31}.

Dysfunktionalitäten der diversen Regulierungsmechanismen können zu drastischen Veränderungen der Knochenstruktur führen. So können genetische Defekte zu einer veränderten Knochenmatrix in Form von erhöhter Knochendichte, die als Osteopetrose bezeichnet wird, führen oder zu einem Verlust der Knochendichte, der als Osteoporose bezeichnet wird.

Die genetischen Mutationen, die der Osteopetrose zugrunde liegen, können Differenzierungs-, Polarisations- oder funktionelle Defekte umfassen, die in einer disproportionalen Zunahme der Knochendichte resultieren. So führt beispielsweise die mutagene Ausschaltung (engl.: Knock-out) des SWAP-70 Gens zu einer beeinträchtigten Aktinring-Bildung in Osteoklasten, die für die Ausbildung der Howship-Lakune essentiell ist. Die M-CSF aktivierte Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K) generiert einen sekundären Botenstoff, das Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat (PIP₃). Dieser Botenstoff reguliert die Zellaktivierung, Umbauprozesse des Zytoskeletts, so wie das Überleben der Zelle. Das Signalprotein SWAP-70 bindet spezifisch an PIP₃ und katalysiert den PIP₃-abhängigen Guanin-Nukleotid-Austausch mit dem Ras-bezogenen C3 Botulinumtoxin Substrat 1 (Rac1) (Abbildung 5a). Somit spielt SWAP-70 eine zentrale Rolle bei den Prozessen des F-Aktin-Aufbaus in der geriffelten Membran, der Zell-Morphogenese, der Integrin-vermittelten Zelladhäsion und bei Migrationsprozessen der Osteoklasten. Ein Mangel an SWAP-70 resultiert in einer verminderten Osteoklastogenese und folglich einem osteopetrotischen Phänotyp. Aber auch andere Mutationen können der Osteopetrose zugrunde liegen. So weisen 50 bis 60 % aller Kinder mit starker Osteopetrose eine Mutation in der A3-Untereinheit der H⁺-ATPase Protonenpumpe auf. Und auch Mutationen des CLCN7 Gens, die zu Abnormalitäten der mit den H⁺-ATPase Protonenpumpen assoziierten Chlorid-Kanäle führen, treten bei autosomal dominanter Osteopetrose auf^{8,13,32-36}.

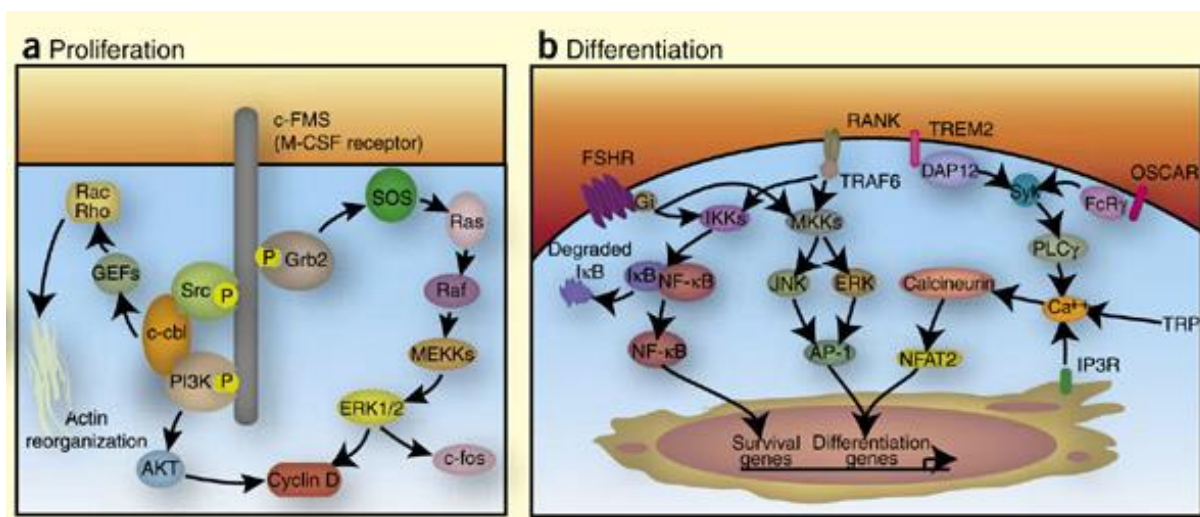


Abb. 5: Molekulare Mechanismen der Osteoklastogenese

(A) Die Aktivierung des M-CSF Rezeptors c-FMS induziert die Phosphorylierung des Phosphoinositide 3-Kinase Komplexes (PI3K), der die Bildung von Aktfasern aktiviert so wie den Akt- und den MAP Kinase Signalweg induziert. Diese laufen in der Bildung von Cyclin D zusammen, das einen wichtigen Zellzyklusregulator darstellt. (B) Die Differenzierung der Osteoklasten ist über verschiedene Rezeptoren wie RANK, TREM2, den Osteoklasten-assoziierten Immunglobulin-ähnlichen Rezeptor (OSCAR) und den Follikel stimulierenden Hormonrezeptor (FSHR) reguliert. RANK benötigt co-stimulierende Signale von TREM2 und OSCAR, um über TRAF6 den Transkriptionsfaktor NFκB und MAP-Kinasen zu aktivieren. DAP12 und FcRγ aktivieren Syk, das die Freisetzung von Kalziumionen (Ca²⁺) induziert und somit die Phosphatase Calcineurin aktiviert. Diese phosphoryliert den Transkriptionsfaktor NFAT2, der die Osteoklastendifferenzierung induziert.³⁶

Des Weiteren können Funktionsverlust-Mutationen (engl.: loss of function mutation) des transmembranen Adaptermoleküls 12 (DAP12) oder des auf myeloiden Zellen exprimierten stimulierenden Rezeptors 2 (engl.: Triggering receptor expressed on myeloid cells 2, TREM2) bei der polyzystischen Lipo-membranösen Osteodysplasie mit sklerosierender Leukoenzephalopathie (PLOSL), die auch als Nasu-Hakola-Krankheit bezeichnet wird, zu osteopetrotischen Knochenmerkmalen führen. DAP12 und TREM2 werden als Komplex auf der Zellmembran exprimiert und durch nicht identifizierte Liganden aktiviert. Dabei wird DAP12 phosphoryliert und aktiviert die zytoplasmatischen Tyrosinkinasen Syk und ZAP70, die weitere Faktoren zu Osteoklastendifferenzierung aktivieren (Abbildung 5b). Der Defekt von DAP12 oder TREM2 führt folglich zur Dysfunktionalität der Osteoklasten und somit zu einer Osteoblasten-basierten erhöhten Knochendichte^{26,36,37}.

Die Osteoporose hingegen beruht auf einem exzessiven Osteoklasten-vermittelten Knochenabbau, der in keinem Verhältnis zum Osteoblasten-basierten Knochen-Neuaufbau steht und somit in einer Reduktion der Knochendichte resultiert¹³. So können Beeinträchtigungen der Osteoblastogenese, wie beispielsweise Mutationen des LRP5 Co-Rezeptors des Wnt/β-Catenin Signalwegs oder Polymorphismen des BMP-2 Gens, zu verminderten Knochendichten beitragen. Aber auch Überexpressionen und Autoimmunreaktionen können Auslöser für Osteoporose sein.

So spielt der Tumornekrose-Faktor- α (TNF- α), der primär von T-Lymphozyten gebildet wird, eine zentrale Rolle bei der Aktivierung von Osteoklasten. Sowohl im Knochenmark lokalisierte Stromazellen als auch Osteoklasten-Vorläuferzellen exprimieren TNF- α Rezeptoren. Durch die Aktivierung dieser Rezeptoren werden insbesondere die Stromazellen zu Bildung von RANKL, M-CSF und Interleukin 1 (IL-1), die die Osteoklastogenese aktivieren, angeregt. Zusätzlich hat TNF- α einen anti-apoptotischen Effekt auf Osteoklasten und verlängert somit deren Lebenszeit³⁸⁻⁴⁰.

Des Weiteren können autoimmune Reaktionen auch zu Knochenabbauprozessen im Rahmen einer rheumatoiden Arthritis führen. Dabei spielen T Helferzellen, die eine Untergruppe der T-Lymphozyten bilden, eine zentrale Rolle. Durch die Sekretierung von Zytokinen, wie IFN- γ und Interleukin 4 (IL-4), können Th1 und Th2 Zellen die Monozyten-Linie bei der Osteoklastogenese inhibieren. Th17-Zellen hingegen, die eine weitere Subpopulation der CD4⁺ T-Helferzellen ausmachen, stellen einen der Hauptregulatoren der Osteoklastenaktivierung in der rheumatoiden Arthritis dar. Sie sekretieren proinflammatorische Zytokine wie IL-17, IL-21 und IL-22, die die Expression von RANKL in synovialen Fibroblasten induzieren, wobei sie selber ebenfalls RANKL produzieren. Durch die Bindung an RANK auf den Osteoklasten-Vorläuferzellen wird deren Differenzierung initiiert. Die somit erhöhte Osteoklastenbildung resultiert in für die rheumatoide Arthritis charakteristischen entzündungsassoziierten Knochenabbauprozessen²⁶.

Aber auch hormonelle Faktoren wie Östrogen können Knochenumbauprozesse beeinflussen und beispielsweise die postmenopausale Osteoporose fördern. Unter anderem kann Östrogen den RANKL/RANK vermittelten Signaltransduktionsweg zur Osteoklastendifferenzierung beeinflussen. Vermutlich inhibiert Östrogen über TRAF6 die Degradation der I κ B Kinase und somit die nukleäre Lokalisation von NF κ B in Osteoklasten (Abbildung 5b). Des Weiteren kann Östrogen die Osteoblasten- und Osteozyten-Apoptose inhibieren. Demnach kann der postmenopausale Östrogenmangel zu verstärkten Knochenabbauprozessen führen und somit einen kritischen Faktor bei der Entwicklung von Osteoporose darstellen^{30,41-43}.

Folglich umfassen die Prozesse des Knochenabbaus und Knochenaufbaus zahlreiche Zellen und Faktoren, deren Interaktionen maßgeblich die Knochenbeschaffenheit und somit die Funktionalität des Knochens, wie die Fortbewegung des Organismus oder die Regulierung der Kalzium- und Phosphat-Homöostase, beeinflussen.

1.4 Die embryonale Knochenentwicklung

Die Zellen, die das Vertebratenskelett bilden, stammen von drei mesodermalen Zelllinien ab. Während das paraaxiale Mesoderm den Großteil des Schädel- und Gesichtskeletts sowie des axialen Skeletts bildet, entwickelt sich aus der Neuralleiste der Branchialbogen des kraniofazialen Skeletts. Die Zellen des lateralen Mesoderms hingegen bilden die Knochen der Extremitäten aus ¹¹. Unabhängig von der Zelllinie erfolgt bei der Knochenbildung die Kondensierung mesenchymaler Vorläuferzellen, die die Knochenentwicklung durch Chondrogenese oder Osteoblastengenese initiieren. Die direkte Differenzierung der mesenchymalen Vorläuferzellen in Osteoblasten erfolgt bei der so genannten desmalen Ossifikation (engl.: intramembraneous ossification), aus der sich flache Knochen entwickeln. Dabei bildet sich in dem stark vaskularisierten fibrösen Mesenchym ein Ossifikationszentrum aus, das zu Osteoblasten differenzierte Mesenchymzellen enthält. Das Gewebe des Ossifikationszentrums wird von den Osteoblasten kalzifiziert, wobei sich die darin eingeschlossenen Zellen weiter zu Osteozyten differenzieren. Das kalzifizierte Gewebe wird dabei zusätzlich von Osteoblasten umschlossen, die wiederum von fibrösem Periost umgeben sind. Da-

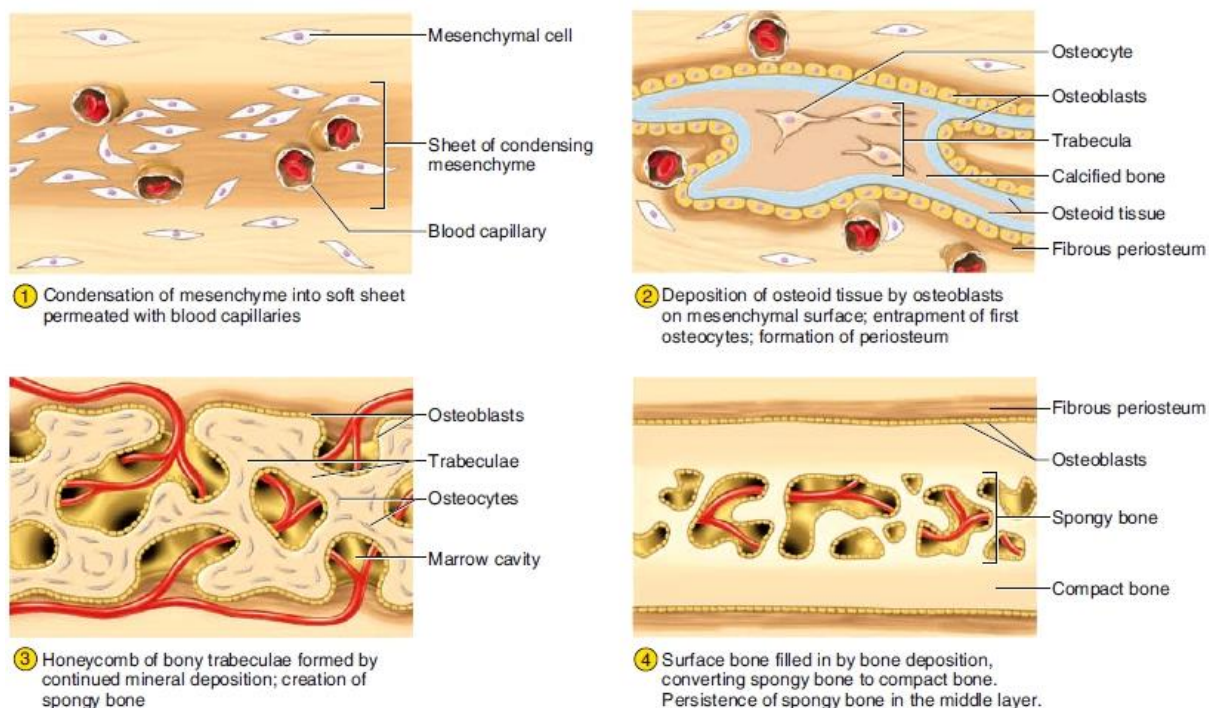


Abb. 6: Mechanismen der desmalen Ossifikation

(1) Bei der Ausbildung des Ossifikationszentrums differenzieren sich die Zellen des Mesenchyms zu Osteoblasten aus. (2) Das Ossifikationszentrum kalzifiziert und die Osteoblasten differenzieren sich weiter zu Osteozyten. Das kalzifizierte Ossifikationszentrum wird durch umgebende Osteoblasten vom Mesenchym separiert. (3) Die Ausbildung der Knochentrabekel geht mit der Vaskularisierung des Knochengewebes einher. (4) Final werden das Periost, der kompakte Knochen und das spongiöse Knochengewebe ausdifferenziert. ²

raufhin erfolgt die Ausbildung von trabekulären Strukturen, so wie die Vaskularisierung des neugebildeten Knochengewebes um die Nährstoffversorgung der beinhalteten Zellen zu gewährleisten. Abschließend werden distinkte Areale des Knochens, das Periost, der kompakte Knochen und das spongiöse Knochengewebe, ausdifferenziert (Abbildung 6). Den Prozessen der desmalen Ossifikation unterliegen beispielsweise die Bildung der Calvaria, der Mandibel und des Schlüsselbeins^{11,44}.

Die Bildung von Röhrenknochen hingegen basiert auf der chondralen Ossifikation, wobei zuerst Knorpelanlagen, die aus hyalinem Knorpel bestehen, im Mesenchym gebildet werden (Abbildung 7). Dabei werden die für die extrazelluläre Matrix typischen Kollagene I und III durch die Knorpel-spezifischen Kollagene II, IV und VI ersetzt. Die Knorpelanlagen sind von einem Chondrozyten-bildenden Perichondrium umgeben, das das Dickenwachstum der Knorpelanlage ermöglicht. Das Längenwachstum der Knorpelanlage wird durch proliferierende Chondrozyten gewährleistet, die anschwellen und somit ihr Zellvolumen massiv vergrößern, was als Hypertrophie bezeichnet wird. Die hypertrophen Chondrozyten in der Knorpelanlage sterben ab, wobei ihre Sekretion von alkalinen Phosphatasen die Kalzifizierung der Knorpelanlage induziert. Dieses kalzifizierte Areal in der Knorpelanlage wird als primäres Ossifi-

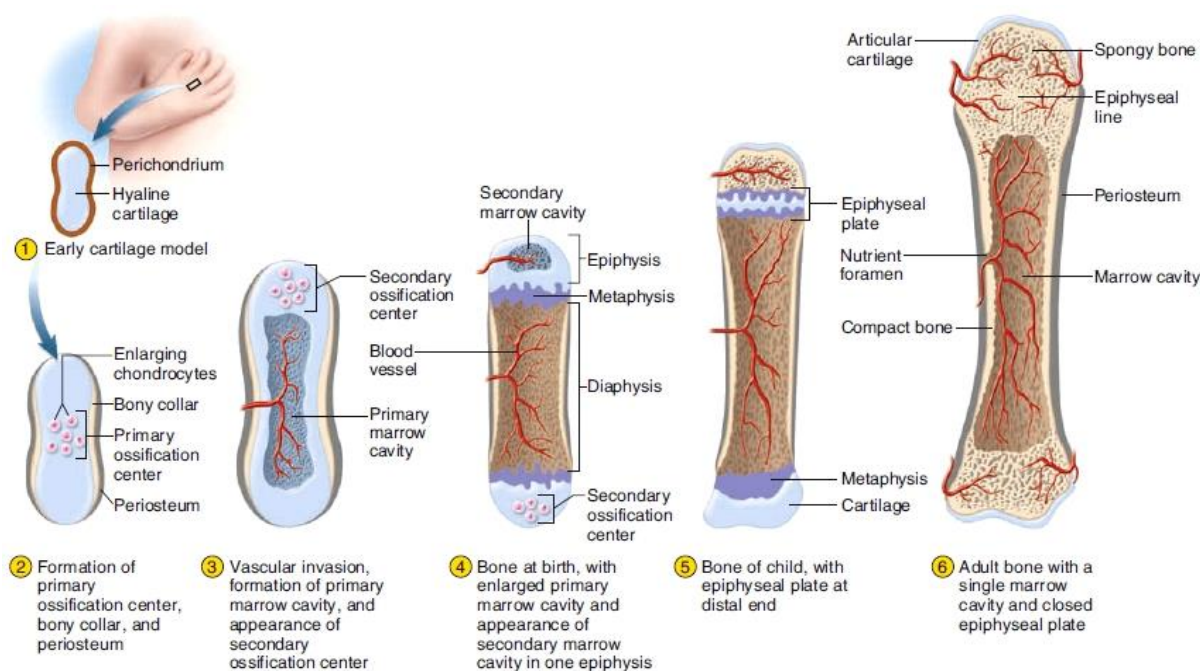


Abb. 7: Schematischer Verlauf der chondralen Ossifikation

1) Bei der chondralen Ossifikation bildet sich in dem mesenchymalen Gewebe ein hyaliner Knorpel aus, der von perichondralem Gewebe umgeben ist. 2) In dem primären Ossifikationszentrum erfolgt die Hypertrophie der Chondrozyten während sich ein Knochenmantel und das Periost um die Knorpelanlage bilden. 3) Die Vaskularisierung der Knochenmarkshöhle ermöglicht die Infiltration von Osteoblasten, die die Knorpelanlage kalzifizieren. Am Endost bilden sich sekundäre Ossifikationszentren aus, die von der Diaphyse separiert vaskularisiert werden (4). 5) Die Diaphyse und die Epiphyse sind durch die knorpelige Wachstumsfuge, die Chondrozyten enthält, voneinander separiert. Die Proliferation und Differenzierung der Chondrozyten in der Wachstumsfuge gewährleistet das Längenwachstum der Knochen. 6) Im adulten Zustand verknöchert die Wachstumsfuge, so dass kein weiteres Längenwachstum der Knochen erfolgen kann.²

kationszentrum bezeichnet. Von diesem Zentrum ausgehend erfolgt die Verknöcherung des späteren Röhrenknochens entsprechend der Mechanismen der desmalen Ossifikation. Allerdings werden bereits dabei Blutgefäße ausgebildet, was hier essentiell ist, da die chondralen Knochen nicht wie bei der desmalen Ossifikation in stark vaskularisierten Geweben gebildet werden, sondern in mesenchymalen Kondensaten, die keine Blutgefäße beinhalten. Die gebildeten Blutgefäße ermöglichen neben der Nährstoffversorgung des Gewebes die Infiltration von Stammzellen in die so genannte primäre Knochenmarkshöhle, die sich mittig im Ossifikationszentrum ausbildet. Die Stammzellen differenzieren sich unter anderem zu Osteoklasten und Osteoblasten. Die Osteoblasten kleiden daraufhin die Knochenmarkshöhle aus und mineralisieren das Knorpelgewebe. Somit entsteht ein temporäres Trabekelnetzwerk.

Des Weiteren differenzieren die Chondrozyten des Perichondriums während des Vaskularisierungsprozesses zu Osteoblasten. Dieses besteht nun somit aus zwei Schichten und wird als Periost bezeichnet. Die fibroelastische Schicht besteht primär aus Collagenfasern und Fibroblasten und ist stark vaskularisiert. Die innere Schicht, das Kambium, ist hingegen kaum vaskularisiert, beinhaltet jedoch osteogene Vorläuferzellen, Osteoblasten und Fibroblasten. Die in dem Kambium lokalisierten Osteoblasten bilden einen so genannten Knochenmantel um die Knorpelanlage aus. Während sich der Knochenmantel bei der Ossifikation immer weiter verdickt und sich entlang der Knorpelanlage ausbreitet, sterben immer mehr hypertrophe Chondrozyten an den distalen Knochenenden ab und kalzifizieren die Knorpelanlage weiter. Die von den Stammzellen gebildeten Osteoklasten bauen den kalzifizierten Knorpel ab, so dass sich die Knochenmarkshöhle in der Diaphyse ausbreitet. An den Epiphysen erfolgen nun ebenfalls die Hypertrophie und der Zelltod der Chondrozyten, wodurch sich sekundäre Ossifikationszentren ausbilden. Auch hier bilden sich Knochenmarkshöhlen über die gleichen Prozesse wie in der Diaphyse aus. Während der weiteren Verknöcherung der Epiphyse, wobei die Knochenmarkshöhle mit Knochen trabekeln ausgekleidet wird, bleibt diese durch eine Knorpelschicht, die Wachstumsfuge, von der Diaphyse separiert. Diese Wachstumsfuge produziert weiterhin Knorpelgewebe, das in Knochengewebe umgewandelt werden kann und somit das Längenwachstum des Knochens ermöglicht. Auch die Osteoblasten des Kambiums bilden weiterhin Knochengewebe, wodurch sich der Knochen parallel zu seiner Länge auch in seiner Dicke entwickelt. Das Kambium nimmt während der Knochenentwicklung allerdings immer weiter an Dicke ab, bis es schließlich nicht mehr von der oberen fibroelastischen Schicht separiert werden kann. Diese Atrophie resultiert in einer

massiven Reduktion der Osteoblastenaktivität und folglich in der Einstellung des Dickenwachstums. Des Weiteren verknöchert die Wachstumsfuge im adulten Zustand und die Knochenmarkshöhlen der primären und sekundären Ossifikationszentren vereinigen sich. Somit kann auch kein Längenwachstum der Knochen von adulten Menschen mehr erfolgen^{2,11,44-46}.

1.5 Angiogenese von Röhrenknochen

Die Bildung von Blutgefäßen ist nicht nur für die Knochenbildung sondern grundsätzlich für die Organogenese und die embryonale und fetale Entwicklung essentiell, da sie die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung sowie den Abtransport von Abfallstoffen gewährleistet.

In der frühen Embryogenese differenzieren sich aus mesodermalen Zellen Hämangioblasten, die Vorläuferzellen von Endothel- und Blutzellen. Diese migrieren in avaskuläre Areale und bilden dort durch Aggregation erste Formen von Blutgefäßen aus. Dieser Prozess wird als Vaskulogenese bezeichnet. Die meisten Blutgefäße bilden sich allerdings durch Prozesse der Angiogenese, dem Wachstum und der Ausbreitung bereits bestehender Gefäße, aus. Das Gefäßwachstum umfasst die Ausweitung, Migration, Differenzierung und Separierung der Endothelzellen.

Die Angiogenese wird durch Hypoxie stimuliert, indem diese verschiedene an der Angiogenese beteiligte Gene hochreguliert. So stellen der vaskuläre endotheliale

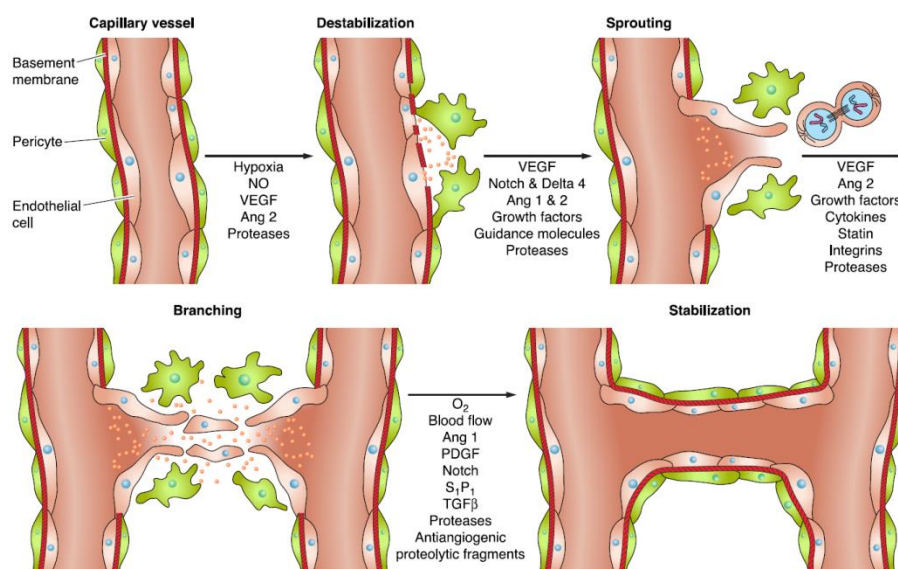


Abb. 8: Die zellulären Mechanismen der Angiogenese und Anastomose

Hypoxie induziert die Bildung von NO und die Expression des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) und Angiopeotin 1 und 2. Diese interagieren mit Proteasen der extrazellulären Matrix und erhöhen so die Permeabilität der Gefäßwand. Diese Destabilisierung ermöglicht die Migration und Proliferation der Endothelialzellen, um neue Gefäßröhren auszubilden. Dies erfolgt durch die Stimulation mittels diverser Faktoren, wie den Wachstumsfaktoren bFGF, PDGF und TGFβ, sowie durch Zytokine, Integrine und Protasen.⁴⁸

Wachstumsfaktor (engl.: vascular endothelial growth factor, VEGF), Angiopoetin 1 und 2 (Ang 1, Ang2), Ephrine und die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) wichtige Faktoren dar, die die Angiogenese unterstützen ⁴⁷⁻⁴⁹.

Während NO die Teilung von Blutgefäßen induziert, trennt VEGF die endothelialen Zellkontakte, was zu einer erhöhten Vasopermeabilität führt. Die abgetrennten Endothelzellen können aus der Basalmembran hinaus und durch den perivaskulären Bereich des Blutgefäßes migrieren, was unter anderem durch VEGF, Ang 1, Ang 2 und den Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 (engl.: basic fibroblast growth factor, bFGF) vermittelt wird. Die Ausweitung und Proliferation der Endothelzellen wird durch diverse angiogene Zytokine wie IL-1 β , Integrine und Proteasen induziert. Der finale Zusammenschluss von Gefäßen, der auch als Anastomose bezeichnet wird, erfolgt mutmaßlich über intrazelluläre und interzelluläre Fusion von großen Vakuolen, die dann Blutgefäßröhren ausbilden (Abbildung 8) ^{48,50}.

Im adulten Zustand ist die Angiogenese in den meisten Geweben stark eingeschränkt und das kapillare Wachstum begrenzt sich weitestgehend auf Reparaturzonen bei der Wundheilung ⁴⁸. Hingegen sind die Umbauprozesse des Knochens, die die ganze Lebensspanne des Organismus fortlaufen, stark an die Angiogenese im Knochengewebe gekoppelt. Dabei verlaufen die Knochenumbauprozesse und die Angiogenese, abhängig von den Knochenarealen, unterschiedlich. Der Umbau von Knochen erfolgt grundsätzlich in spezifischen distinkten Arealen (engl.: bone remodeling compartment, BRC) und wird beim Umbau von trabekulärem Knochen durch eine charakteristische Schicht aus Knochenoberflächenzellen und Osteoblasten vom Knochenmark abgeschiedet (engl.: basic multicellular units, BMU). Der BMU-Bereich ist von zahlreichen Blutgefäßen umgeben, die die Migration und Infiltration von HSCs und MSCs in das BRC ermöglichen, wo diese zu Osteoblasten und Osteoklasten ausdifferenzieren. Die Endothelzellen und die perivaskulären Zellen der Blutgefäße, die Perizyten, können auch direkt mit den Zellen im BRC kommunizieren und den Knochenumbau regulieren. Des Weiteren ist es möglich, dass Immunzellen, wie beispielsweise T-Zellen, durch die Blutgefäße zu den BRCs gelangen und dort durch die Freisetzung von Promotoren oder Inhibitoren der Osteoklastogenese die Knochenumbauprozesse beeinflussen (Abbildung 9) ^{30,47,51}.

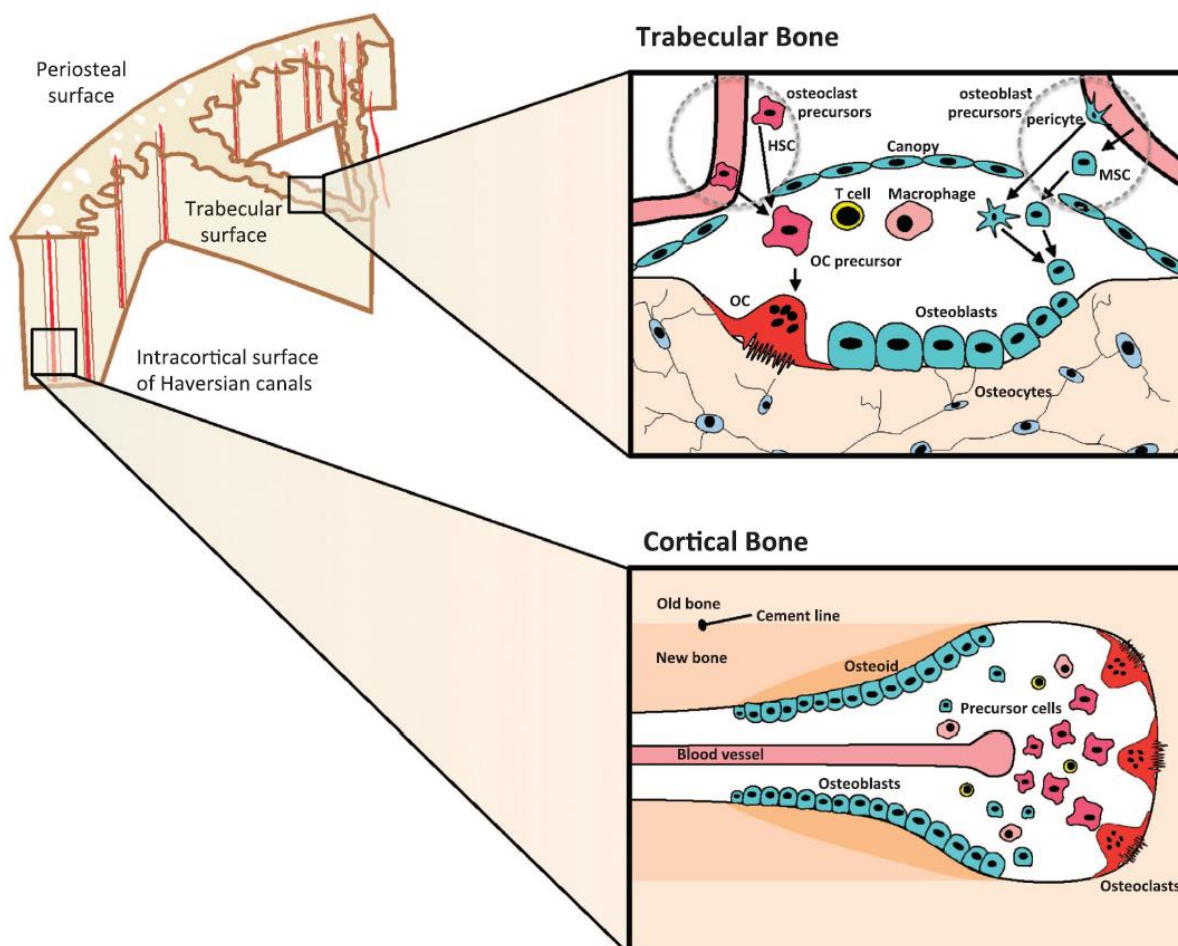


Abb. 9: Strukturelle Aspekte des Umbaus von trabekulärem und kompaktem Knochen

Der Umbau von trabekulärem Knochen ist durch die Ausbildung einer Zellschicht (engl.: canopy), die das Areal des Knochenumbaus (BRC) vom Knochenmark separiert und aus Knochenoberflächenzellen und Osteoblasten besteht, charakterisiert. Über zahlreiche Blutgefäße, die diese Grenzschicht umgeben, können MSCs und HSCs zu dem BRC migrieren und dort zu Osteoklasten und Osteoblasten ausdifferenzieren. Auch Immunzellen wie T-Zellen und Makrophagen, können über die Blutgefäße zum BRC gelangen und dort den Knochenumbau beeinflussen. Im kompakten Knochen (engl.: cortical bone) gelangen die Osteoklasten- und Osteoblastenvorläuferzellen durch Blutgefäße, die zentral in Volkmann'schen und Havers'schen Kanälen durch den kompakten Knochen verlaufen, zu den BRCs. Durch infiltrierende Immunzellen, ausgereifte Osteoblasten aber auch direkt durch die Endothelzellen der Blutgefäße wird die Ostoklastogenese reguliert.⁵¹

Der Umbau des kompakten Knochens hingegen erfolgt ohne die BMU-Ausbildung in so genannten Havers'schen und Volkmann'schen Kanälen. Diese zylindrischen Kanäle bilden ein verästeltes Netzwerk im kompakten Knochen, wobei die Havers'schen Kanäle vertikal und die Volkmann'schen Kanäle horizontal durch den Knochen verlaufen. Neben Nervenfasern verlaufen zentral in den Kanälen auch Blutgefäße, die die Migration und Infiltration von diversen Vorläuferzellen in den Bereich des Knochenumbaus ermöglichen. So stammen die in das BRC migrierenden Zellen der Osteoblasten-Linie von im Knochenmark lokalisierten MSCs oder von Perizyten ab. Der Austritt von Osteoklastenvorläuferzellen in das BRC wird über chemotaktische Faktoren wie Sphingosin-1-Phosphat, das wiederum durch 1,25-Dihydroxyvitamin-D₃ stimuliert wird, angeregt. Die Signale, die die Osteoklastendifferenzierung und -aktivierung regulieren, wie M-CSF, RANKL, VEGF und NO, werden

in dem BRC sowohl von den Zellen der Osteoblastenlinie als auch von den Endothelzellen selbst exprimiert. Aber auch T-Zellen und Makrophagen, die die Osteoklastogenese beeinflussen können, können über die Blutgefäße zum BRC gelangen. Die Angiogenese der in den Kanälen befindlichen Blutgefäße wird beispielsweise durch BMPs reguliert. Diese regen Osteoblasten an, VEGF zu exprimieren, was das Gefäßwachstum initiiert. Der fortschreitende Knochenumbau in den Knochenkanälen ist von der Angiogenese abhängig, da die Blutgefäße die Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen, so wie die weitere Rekrutierung von Knochen- und Immunzellen gewährleisten^{5,6,30,47,51-53}.

1.6 Das Blutgefäßsystem des Röhrenknochens

Voll ausgebildete Blutgefäße bestehen aus einer inneren Schicht von Endothelzellen, der tunica intima, die von einer mittleren Schicht, der tunica media, umgeben ist. Diese besteht aus glatter Muskulatur und Kollagenfasern und stellt in der Regel die dickste Gefäßschicht dar. Die tunica externa, die äußerste Gefäßschicht oder Basallamina, beinhaltet neben lymphatischen Gefäßen und Nervenfasern auch Perizyten, die direkte Zell-Zell-Kontakte mit den glatten Muskelzellen und den Endothelzellen ausbilden können. Je nach ihrer zellulären Zusammensetzung kann zwischen verschiedenen Gefäßtypen, wie Venen, Arterien oder Sinusoiden unterschieden werden. Arterien, die sauerstoffreiches Blut transportieren, weisen beispielsweise gegenüber Venen, die sauerstoffarmes Blut transportieren, eine deutlich verdickte tunica media auf und können über spezifische Marker, wie das Aktin der glatten Muskulatur (engl.: smooth muscle actin, SMA) und das Proteoglykan NG2, identifiziert werden. Venen hingegen können beispielsweise über die spezifische Expression von Endomucin, einem endothelialen Sialomucin, identifiziert werden. Als Sinusoide werden venöse diskontinuierliche Kapillaren bezeichnet, die sowohl im Knochenmark als auch in der Leber und der Milz auftreten können. Dieser Gefäßtyp zeichnet sich durch große Zwischenräume zwischen den Endothelzellen und eine fehlende Basallamina aus. Die als „Fensterung“ bezeichneten Zwischenräume zwischen den Endothelzellen, ermöglichen es großmolekularen Proteinen aber auch ganzen Blutzellen die Gefäßmembran problemlos zu passieren. In der Leber können somit beispielsweise Albumin und Gerinnungsfaktoren in die Blutzirkulation gelangen^{2,47,54-57}.

Im Röhrenknochen ist das Knochenmark von einem sinusoidalen Netzwerk, dessen Endothelproliferation auf den Mechanismen der Angiogenese beruht, ausgefüllt. Dabei kann zwischen so genannten Typ-H Kapillaren, die stark das Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül (PECAM1, CD31) und Endomucin exprimieren, und Typ-L Kapillaren, die geringe CD31- und Endomucin-Expressionen aufweisen, unterschieden werden. Die Typ-H Kapillaren sind primär an der Metaphyse, einem

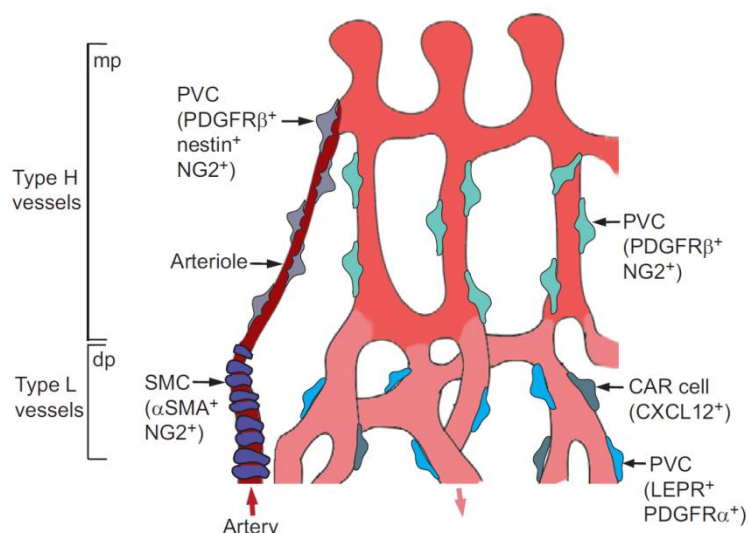


Abb. 10: Aufbau des Blutgefäßnetzwerks im Röhrenknochen

Im Knochenmark der Diaphyse (dp) lokalisierte Arterien sind durch glatte Muskelzellen (SMC), die das Aktin der glatten Muskulatur (engl.: smooth muscle actin, SMA) und das Proteoglykan NG2 exprimieren, charakterisiert. An der Metaphyse (mp) verbinden sich die Arteriolen mit Typ-H Sinusoiden, deren perivaskuläre Zellen (PVCs), die Perizyten, spezifisch für den Plättchen-abstammenden Rezeptor des Wachstumsfaktors β (engl.: platelet-derived growth factor receptor, PDGFR β) sind. Die Typ-H Gefäße der mp sind mit Typ-L Sinusoiden verbunden, die in der dp lokalisiert sind und im Gegensatz zu Typ-H Sinusoiden lediglich eine schwache Expression von Endomucin und dem Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül PECAM1, der auch als CD31 bezeichnet wird, aufweisen.⁴⁷

Bereich zwischen der Diaphyse und der Wachstumsfuge, und am Endost lokalisiert, während die Typ-L Kapillaren die mit den Typ-H Kapillaren verbunden sind, das restliche Knochenmark ausfüllen. Dieses Typ-L-Gefäßnetzwerk läuft in der Mitte des Knochenmarks zu einem großen Zentralsinus zusammen, der das Blut aus dem Knochen transportiert. In Röhrenknochen hinein gelangt das Blut über Hauptarterien (engl.: nutrient artery, NA), die sich an der Metaphyse des Knochens befinden, und durch den kompakten Knochen in das Knochenmark verlaufen. Diese verbinden sich jedoch nicht mit Typ-L Kapillaren sondern ausschließlich mit Typ-H Kapillaren an der Metaphyse und dem Endost (Abbildung 10)^{2,47,54-57}.

Folglich ist laut Sivaraj und Adams die Diaphyse stark hypoxisch, da sie über keine direkte arterielle Versorgung verfügt und primär mit hämatopoetischen Zellen gefüllt ist, während die Metaphyse vergleichsweise gut mit Sauerstoff versorgt wird⁴⁷. Im genauen Gegensatz dazu wird aber auch vielfach eine dominante Hauptarterie an der Diaphyse beschrieben, die sich im Knochenmark verzweigt und dort mit den Sinusoiden verbindet. Folglich wird dieses Gefäß auch vielfach als der zentrale Zufluss, der die Nährstoff- und Sauerstoffversorgung des Knochens gewährleistet, bezeichnet. Allerdings beschreiben auch diese Modellansätze keinen vollständigen geschlossenen Blutkreislauf im Röhrenknochen, da sie sich entweder ausschließlich

auf die arterielle Blutgefäßversorgung fokussieren, widersprüchliche Entwürfe des sinusoidealen Netzwerkes und seiner Verbindung zu arteriellen Gefäßen aufweisen, oder aber nur Teilbereiche des Knochens, wie die Metaphyse, beschreiben (Abbildung 11)^{2,9,47,54-65}.

Des Weiteren beziehen sich sowohl das Modell des Blutflusses im Knochen von Sivaraj und Adams, das auf dem aktuellen Wissensstand basiert, so wie die meisten der übrigen Modelle ausschließlich auf die Blutgefäßarchitektur im Knochenmark, während das Gefäßnetzwerk innerhalb des kompakten Knochens, die Havers'schen und Volkmann'schen Kanäle, vollständig außer Acht gelassen wird. Dabei ist die strukturelle Organisation der Volkmann'schen und Havers'schen Kanäle im humanen kompakten Knochen bereits vielfach umfassend beschrieben worden und auch vergleichbare Kanalstrukturen in Röhrenknochen von Hasen, Ratten und Mäusen konnten primär mittels Mikro-Computertomographie (μ -CT) Aufnahmen visualisiert und analysiert werden^{60,66-72}. Es wurde in diesen Studien vermutet, dass diese Kanäle Blutgefäße beinhalten, die in einer Arbeit von Pablo Bianco 2011 mittels Mikroradiographie gezeigt und als intraosseäre Gefäße bezeichnet wurden⁷³. Ob es sich dabei wirklich um Blutgefäße handelt konnte aufgrund der Einschränkungen der verwendeten Methoden aber in keiner der aufgeführten Arbeiten eindeutig geklärt werden. So werden sowohl bei μ -CT- als auch bei Mikroradiographie-Aufnahmen Kanalstrukturen im kompakten Knochen lediglich als Hohlräume dargestellt, die keine Aussagen zu den beinhalteten weichen Gewebestrukturen zulassen. Zwar können beispielsweise durch die Applikation von Kontrastmitteln Blutgefäße mittels μ -CT dargestellt werden, allerdings ermöglicht der geringe Kontrastunterschied zwischen den Gefäßen und dem kompakten Knochen keine klare Separierung der Strukturen, was in unklaren Messergebnissen, bei denen beispielsweise die Blutgefäße ein größeres Volumen als die eigentlichen Kanäle aufweisen, resultiert⁷⁰. Des Weiteren liefern diese Methoden keine Informationen zu den vorliegenden Gefäßtypen oder zum Blutfluss, wie dessen Richtung oder Geschwindigkeit. Mittels der intra-vitalen 2-Photonen-Mikroskopie (engl.: two-photon laser scanning microscopy, TPLSM), die die Visualisierung von spezifisch fluoreszent markierten Strukturen und auch des Blutflusses durch frei zirkulierende Farbstoffe wie Dextrane ermöglicht, konnten allerdings von unserer Arbeitsgruppe erstmals blutgefüllte Poren im kompakten murinen Röhrenknochen *in vivo* beobachtet werden. Doch wurden dabei keine umfassenden Analysen zu diesen Poren oder Kanälen erstellt⁷⁴.

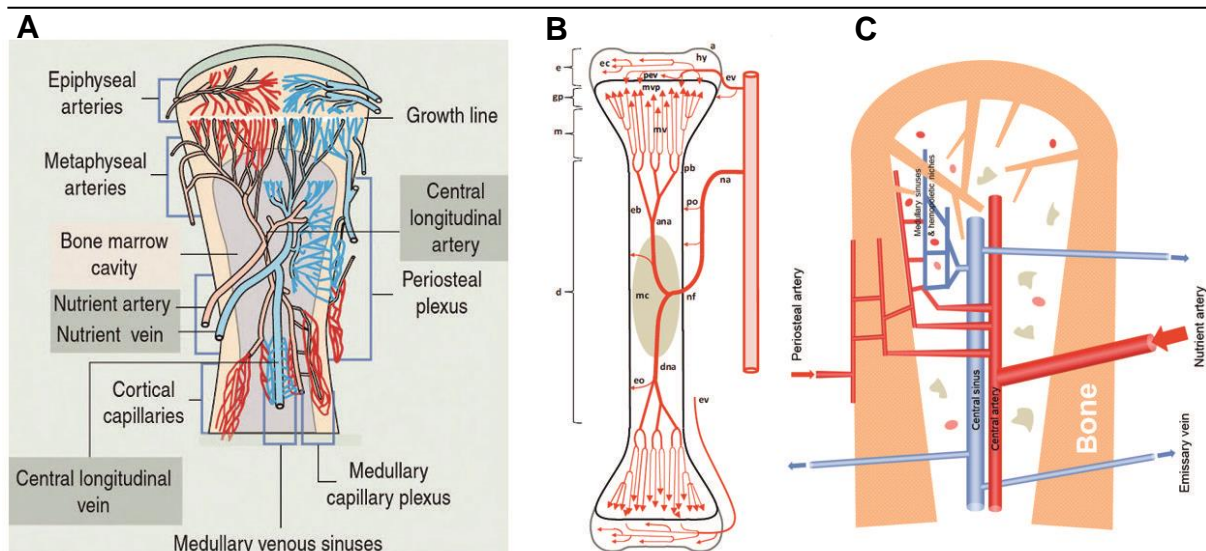


Abb. 11: Verschiedene Modellansätze der Blutgefäßversorgung von Röhrenknochen

(A) In diesem Modell durchdringen eine Hauptarterie an der Diaphyse sowie zahlreiche Arterien an der Metaphyse den kompakten Knochen und verzweigen sich im Knochenmark. Dort können sie ein arterielles Netzwerk ausbilden, das Havers'sche und Volkmann'sche Kanäle umfasst, oder sich direkt mit venösen Sinusoiden verbinden, die im zentralen Sinus zusammenlaufen. Ein weiteres Konzept zeigt die Havers'schen und Volkmann'schen Gefäße als venöse Kapillaren, die sowohl mit dem periostalen Gefäßplexus, als auch mit dem medullären Sinuskomplex verbunden sein können. Des Weiteren werden auch große venöse Gefäße, die an der Metaphyse in den Knochen ein- oder aus dem Knochen austreten dargestellt. (B) Dieses Knochenmodell stellt ausschließlich die arterielle Blutgefäßversorgung des Röhrenknochens dar. Demnach dringt eine Hauptarterie (na) an der Diaphyse (d) in den Knochen ein und verzweigt sich im Knochenmark immer weiter bis zur Wachstumsfuge (gp) an der Metaphyse (m). Essentielle arterielle Zugänge an der Metaphyse, ein generelles venöses System, so wie das Blutgefäßsystem des kompakten Knochens werden hier nicht dargestellt. (C) Das dritte Knochenmodell zeigt neben der Hauptarterie (nurtient artery) auch die arterielle Versorgung des Knochens über periostale Arterien, die in Form von Havers'schen und Volkmann'schen Kanälen durch den kompakten Knochen verlaufen und sich im Knochenmark mit der Zentralarterie oder Sinusoiden verbinden. Die Sinusoide stehen mit dem Zentralsinus in Verbindung, der an diversen Stellen aus dem Knochen austritt. Distinkte Areale wie die Metaphyse oder die Diaphyse werden nicht berücksichtigt. Auch wird hier nicht dargestellt, wie die zentrale Arterie und der zentrale Sinus weiter verlaufen.^{63,64,65}

Grundsätzlich ist in keinem aktuell vorliegenden Modell zum Blutgefäßnetzwerk des Röhrenknochens geklärt, ob tatsächlich Blutgefäße im kompakten Knochen vorliegen, um welche Gefäßtypen es sich dabei handelt und inwiefern diese mit dem Gefäßsystem des Knochenmarks assoziiert sind^{9,58-64}. Auch liegen bis heute nahezu keine Publikationen vor, die quantitative Daten zur Anzahl an Gefäßen oder den Gefäßtypen, die den kompakten Knochen durchlaufen, liefern. Dies merkten auch Maggiano et al. in einer Publikation, die 2016 im Journal of Anatomy erschien, durch den Verweis auf eine einzige Publikation aus dem Jahre 1966 an. Laut Maggiano et al. ist dieses Defizit an wissenschaftlichen Daten ein klares Anzeichen für das Erfordernis weiterer Studien, um beispielsweise die Zusammenhänge der BMU-Aktivität, der strukturellen Organisation der Blutgefäße, der Anastomose und der Angiogenese aufzuklären⁶⁷.

Das Verständnis des geschlossenen Blutkreislaufs im Röhrenknochen ist weiterhin essentiell um diverse immunologische Mechanismen, wie die Mobilisierung von Immunzellen aus dem Knochenmark in die Peripherie aufzuklären. Zur Zell-

Mobilisierung, bei der verschiedene Stimuli die Zellfortbewegung initiieren, werden bevorzugt Blutgefäße genutzt um möglichst schnell an den jeweiligen Zielort zu gelangen. So werden beispielsweise HSCs mit dem Blutstrom über Blutgefäße zu definierten Gewebearealen transportiert, wo sie aus den Gefäßen auswandern und zu definierten Zelltypen differenzieren können ^{75,76}. Aber auch bei der Immunantwort spielen Mobilisierungsprozesse eine zentrale Rolle. So nutzen beispielsweise polymorphnukleäre neutrophile Granulozyten (PMNs) gezielt Blutgefäße, um möglichst schnell an Entzündungsherde oder zu pathogenen Erregern im Organismus zu gelangen. Die entsprechenden Mechanismen, mittels derer die PMNs an den Gefäßwänden stoppen und durch diese hindurch in das umliegende Gewebe migrieren, sind bereits umfassend beschrieben worden ⁷⁷⁻⁸¹.

Auch konnte die Einwanderung von PMNs in das Gefäßsystem im murinen Knochenmark nach der gezielten Zellaktivierung mittels des Granulozyten-Kolonie stimulierenden Wachstumsfaktors (engl.: granulocyte colony stimulating growth-factor, G-CSF) *in vivo* gezeigt werden. Die Zellaktivierung erfolgt demnach bereits wenige Minuten nach der Applikation des Stimulus, was auf einen schnellen Transport des G-CSF's in das Knochenmark hindeutet. Die Migration der PMNs in das vaskuläre System wiederum führt zu einem deutlichen Anstieg der Zellpopulation in der generellen Blutzirkulation innerhalb weniger Minuten ⁷⁴. Folglich müssen die in das Blutgefäßsystem des Knochenmarks eingewanderten PMNs durch effektive Gefäßverbindungen mit der generellen Blutzirkulation aus dem Knochen heraustransportiert werden. Die entsprechend dazu genutzten Strukturen, beziehungsweise die genauen Transportwege der Zellen aus dem Knochen sind jedoch nicht bekannt. So ist unklar ob die Mobilisierung der PMNs homogen im gesamten Röhrenknochen erfolgt oder spezifische Areale wie die Metaphyse oder Diaphyse eine stärkere Rekrutierung ermöglichen, ob alle vorhandenen Gefäßtypen zur Einwanderung aus der Gewebematrix in das vaskuläre System des Knochenmarks genutzt werden oder spezifische Gefäßtypen wie Arterien oder Sinusoide bevorzugt genutzt werden und wie die PMNs über die Knochenmarkvaskularisation aus dem Knochen in die generelle Blutzirkulation gelangen ist weitgehend unbekannt.

Über die immunologischen Aspekte hinaus ist die Aufklärung des geschlossenen Blutkreislaufs im Röhrenknochen auch für diverse klinische Anwendungen relevant. So findet beispielsweise die intraosseeäre Infusion breite klinische Anwendung als alternativer venöser Zugang in der Notfallmedizin, da sie dieselben pharmakokineti-

schen Parameter wie eine klassische venöse Injektion aufweist^{58,82,83}. Die strukturellen Aspekte, die die schnelle medikamentöse Versorgung des Organismus‘ über diese Injektionsroute ermöglichen, sind aber unklar. Ebenso würde das Verständnis des Blutkreislaufes im murinen Röhrenknochen die Aufklärung grundlegender Mechanismen knochen-assoziiierter Erkrankungen fördern. So ist beispielsweise die initiale Pathogenese der rheumatoiden Arthritis noch weitgehend ungeklärt. Dabei ist unklar, ob die Gelenkentzündung aus Entzündungsprozessen im Knochen, wie Knochenzysten, entspringt, die sich auf das Gelenk ausweiten, oder ob die Entzündung zuerst in der synovialen Membran des Gelenks lokalisiert ist und dann Immunantworten in dem angrenzenden Knochen initiiert⁸⁴.

Die Aufklärung der strukturellen und auch funktionellen Aspekte des Blutgefäßsystems im Röhrenknochen mittels geeigneter bildgebender Verfahren könnte es ermöglichen, erstmals ein konsistentes Modell eines geschlossenen Blutkreislaufs im Röhrenknochen zu etablieren. Dies könnte neue Erkenntnisse hinsichtlich der Aktivierung, Rekrutierung, Migration und Infiltration von Immunzellen aus dem Knochenmark an periphere Wirkorte liefern, die auch Rückschlüsse auf knochenassoziierte Erkrankungen ermöglichen würden.

1.7 Analysen des Knochens mittels bildgebender Verfahren

Dass das Blutgefäßsystem sowie der geschlossene Blutkreislauf im Röhrenknochen anhand konträrer Modelle beschrieben werden, zeigt eine fundamentale Wissenslücke hinsichtlich dieser Strukturen auf. Dies könnte durch die Unzugänglichkeit dieses Organs bedingt sein, die auf der Beschaffenheit des Knochens, insbesondere der enormen Festigkeit der Kompakta, beruht.

Den wohl direktesten Ansatz zur Aufklärung der Blutgefäßstrukturen stellt die Nutzung bildgebender Verfahren zur Visualisierung von Knochen dar. So wurden bereits diverse Methoden wie die Magnetresonanztomographie (MRT), die Computertomographie (CT) oder auch die Elektronenmikroskopie (ELMI) eingesetzt, um Knochen zu visualisieren und zu analysieren^{16,68,69,71,85-91}. Diese Methoden ermöglichen zwar die dreidimensionale Darstellung und Analyse der Knochenstruktur, spezifische Strukturen wie Venen oder Arterien können mittels dieser Techniken jedoch nicht identifiziert werden. Eine spezifische Markierung zur Identifizierung von definierten Gewebestrukturen ermöglichen aber fluoreszent markierte Antikörper, die in ver-

schiedenen Verfahren der Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt werden. So finden beispielsweise die konfokale Laserrastermikroskopie (engl.: confocal laser scanning microscopy, CLSM) und die TPLSM breite Anwendung bei der Untersuchung osseärer Strukturen. Allerdings ermöglichen die CLSM und die TPLSM lediglich optische Eindringtiefen von bis zu 100 µm im Knochen und bieten dabei nur ein kleines Sichtfeld von wenigen hundert Mikrometern. Somit können mit diesen Methoden lediglich Objekte mit einer geringen Größe vollständig erfasst werden⁹²⁻⁹⁴. Die daher aktuell gängigste Methode, um tiefer in Organen lokalisierte Strukturen, wie beispielsweise das Knochenmark im Röhrenknochen, zu analysieren, stellt daher die Anfertigung histologischer Schnitte dar. So stellen serielle histologische Schnitte, die mit entsprechenden rechnergestützten Programmen zu 3D-Modellen zusammengesetzt werden können, eine Option dar, um ganze Organe oder Organismen mikroskopisch zu untersuchen. Damit können zwar tiefer liegende Strukturen analysiert werden, dieses Verfahren ist aber sehr zeitaufwändig und fehlerbehaftet. Einzelne Gewebeschnitte können bei ihrer Anfertigung durch die mechanische Belastung zerreißen, gestaucht, gedehnt oder anderweitig beschädigt werden, so dass sie verworfen werden müssen. Dies wiederum beeinträchtigt die Rekonstruktion von vollständigen 3D-Modellen maßgeblich^{92,95,96}.

Um aber anatomische und funktionelle Studien an biologischen und medizinischen Proben durchführen zu können, ist es essentiell diese Limitierungen zu überwinden und die Studienobjekte in ihrer dreidimensionalen Gesamtheit analysieren zu können. Einen Lösungsansatz stellt die Lichtblatt Fluoreszenzmikroskopie (engl.: Light-Sheet Fluorescence Microscopy, LSM) dar, die auch als Ultramikroskopie bezeichnet wird. Diese Methode ermöglicht die dreidimensionale Mikroskopie ganzer Organe und kleiner Organismen, wie adulten *Drosophila* oder Rattenembryonen, bis zu einer Größe von 2 cm. Dabei wird aber dennoch eine Einzelzellauflösung im Mikrometerbereich erreicht, die die Analysen fluoreszenter struktureller Komponenten und die Anordnung einzelner Zellen in Geweben ermöglicht^{92-95,97-103}.

Allerdings stellt die Opazität, die optische Undurchlässigkeit, biologischer Gewebe bei allen lichtbasierten mikroskopischen Methoden, wie der CLSM, der TPLSM und auch der LSM, einen limitierenden Faktor hinsichtlich der optischen Eindringtiefe dar. Ein etabliertes Verfahren um die Lichtstreuung in biologischen Proben und somit die Opazität zu minimieren ist die Optimierung der optischen Durchlässigkeit (engl.: optical clearing). Dabei werden die verschiedenen refraktiven Indices (RIs) in dem

Zielgewebe mittels spezieller Immersionsmedien homogenisiert. Die dadurch induzierte Reduktion der Lichtstreuung resultiert in einer erhöhten Transparenz und ermöglicht somit erhöhte Eindringtiefen in das jeweilige Gewebe. Da die unterschiedlichen Gewebe und Organe eine weite Variabilität von RIs aufweisen, sind bereits zahlreiche Protokolle zur Homogenisierung von RIs und der Optimierung der optischen Durchlässigkeit publiziert worden. Demnach kann mittels diverser Immersionsmedien, die ein breites Spektrum von RIs umfassen, die Transparenz verschiedenster Organe und Gewebe individuell erzielt werden^{92,94,95,98,99,101,103,104}. Allerdings lag zu Beginn dieser Doktorarbeit kein etabliertes Verfahren vor, das die Optimierung der optischen Durchlässigkeit von murinen Knochen unter Erhalt endogener Fluoreszenzproteine ermöglichte. Um aber das Blutgefäßsystem in murinen Röhrenknochen in seiner Gesamtheit visualisieren und analysieren zu können und mittels spezifischer fluoreszenter Markierungen definierte Strukturen im murinen Knochen identifizieren zu können, ist eine solche Methode essentiell.

1.8 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte der geschlossene Blutkreislauf muriner Röhrenknochen mittels bildgebender Verfahren aufgeklärt werden. Dabei sollten sowohl strukturelle als auch funktionelle Aspekte des Blutgefäßsystems ermittelt werden, um Aufschluss über Migrationsprozesse von Immunzellen aus dem Knochenmark an periphere Wirkorte und den Einfluss von knochenverändernden Erkrankungen, wie Osteoporose, Osteopetrose oder rheumatoider Arthritis, auf diese Prozesse zu erzielen.

Knochen stellen ein hoch spezialisiertes Gewebe dar, in dem die Hämatopoese, die Bildung von Blutzellen und insbesondere den Immunzellen, aus HSCs erfolgt⁵. Es konnte bereits gezeigt werden, dass HSCs in unterschiedlichen Bereichen des Knochenmarks, in der Osteoblasten-Nische am Endosteum und in der vaskulären Nische an Blutgefäßen, lokalisiert sein können. Die Ausbildung dieser Nischen erfolgt während der endochondralen Ossifikation, die ausschließlich Röhrenknochen umfasst. In flachen Knochen, die durch intramembrane Ossifikation gebildet werden, konnten bisher keine HSC-Nischen nachgewiesen werden¹⁰⁵. Dementsprechend erfolgt in murinen Röhrenknochen die Hämatopoese über die gesamte Lebenszeit der Maus, was für flache Knochen nicht gezeigt werden konnte⁷³. Folglich stellen Röhrenkno-

chen eine eigenständige Knochengruppe dar, deren Mechanismen zur Generierung und Rekrutierung von Immunzellen sich vermutlich grundlegend von denen der flachen Knochen unterscheiden¹⁰⁶. Daher fokussiert sich diese Doktorarbeit auf die strukturelle und funktionelle Analyse von Röhrenknochen.

- **Etablierung eines Verfahrens zur Optimierung der optischen Durchlässigkeit**

Um den Aufbau des Blutgefäßsystems in ganzen murinen Röhrenknochen zu visualisieren und aufzuklären sollte die fluoreszenzbasierte Lichtblattmikroskopie genutzt werden. Aufgrund des großen Sichtfeldes ermöglicht diese Methode Proben bis zu einer Größe von 2 cm bei hoher subzellulärer Auflösung zu visualisieren. Dabei können definierte Strukturen oder Zelltypen durch die jeweilige Expression spezifischer Marker fluoreszent markiert und somit identifiziert werden. Zur Detektion von Fluoreszenzsignalen in ganzen Organen ist jedoch ein chemisches Verfahren, dass die Organe transparent macht indem es die optische Durchlässigkeit mittel Anpassung der gewebespezifischen refraktiven Indices optimiert (engl.: optical clearing), notwendig. Da die LSM bisher primär zur Analyse neuronaler Strukturen genutzt wurde, lagen zu Beginn dieser Doktorarbeit keine geeigneten Verfahren vor, um auch Knochen transparent zu machen. Folglich sollte eine entsprechende Methode entwickelt werden, die neben Antikörper-basierten Fluoreszenzfärbungen auch endogen exprimierte Fluoreszenzproteine erhält, um die Visualisierung von entsprechend fluoreszenten Zelltypen in transgenen Mauslinien zu ermöglichen. Des Weiteren sollten spezifische Antikörperfärbungen zur Identifizierung von arteriellen und venösen Gefäßen etabliert werden, die bei der entsprechenden Methode zur Optimierung der optischen Durchlässigkeit angewendet werden können.

- **Quantitative Analysen des Blutgefäßsystems und Aufklärung eines geschlossenen Blutkreislaufs im murinen Röhrenknochen**

Da der Knochen aufgrund seiner enormen Gewebefestigkeit ein besonders unzugängliches Organ darstellt, sollte die entsprechende Methode zur Optimierung der optischen Durchlässigkeit erst an einem exemplarischen weichen Organ etabliert werden. Aufgrund ihrer starken Vaskularisation sollte dazu die Niere verwendet werden. Um zu überprüfen, ob sich krankheitsbedingte Änderungen von Blutgefäßen mittels LSM detektieren und analysieren lassen, sollten endotheliale Schädigungen in der Niere, die mittels einer nephrotoxischen Nephritis induziert wurden, analysiert werden. Neben der Visualisierung dieser Strukturen sollten auch Verfahren zur Quantifizierung von Endothelstrukturen etabliert werden. Aufbauend auf diesen me-

thodischen Etablierungen sollten dann murine Knochen analysiert werden, wobei neben der Identifizierung der Blutgefäßtypen und Aufklärung ihrer strukturellen Organisation auch Quantifizierungen der jeweiligen Gefäßtypen im gesamten Knochen erfolgen sollten.

- **Analysen der Mobilisierungsprozesse im murinen Röhrenknochen**

Zusätzlich zu der Aufklärung des geschlossenen Blutkreislaufs im murinen Röhrenknochen sollte die Funktionalität der jeweils identifizierten Blutgefäße geklärt werden. Da die LSM die Mikroskopie von Strukturen im Knochen nur *in situ* ermöglicht, sollte hierzu die intra-vitale TPLSM *in vivo* genutzt werden. So sollte der Blutfluss visualisiert werden um Fließgeschwindigkeiten und Flussrichtungen in den verschiedenen identifizierten Gefäßstrukturen zu analysieren. Auch sollte *in vivo* ermittelt werden, welche Gefäße von Immunzellen zur Mobilisierung aus dem Knochenmark an periphere Wirkorte genutzt werden. Dafür sollte die Aktivierung von PMNs mittels G-CSF als Modell der Notfallrekrutierung von Immunzellen, die innerhalb weniger Stunden erfolgt, verwendet werden⁷⁴. Der Transport der PMNs aus dem Knochenmark in die generelle Blutzirkulation sollte dabei auch mittels durchflusszytometrischer Messungen quantifiziert werden.

- **Analyse des Blutgefäßsystems bei knochenverändernden Erkrankungen**

Nach der Aufklärung des geschlossenen Blutkreislaufs im murinen Röhrenknochen und der Funktionalität der spezifischen Gefäßtypen hinsichtlich der Immunzellmobilisierung, sollte schließlich der Einfluss von knochenverändernden Krankheiten auf das Blutgefäßsystem und die Zellmobilisierung überprüft werden. Dazu sollte die Osteopetrose anhand des SWAP70^{-/-} Mausmodells, die Osteoporose mittels des TNFtg Mausmodells und die rheumatoide Arthritis, die in DBA1 DREG Mäusen induziert wurde, untersucht werden. Es sollten sowohl das gesamte Blutgefäßsystem in den jeweiligen Mausmodellen mittels LSM, als auch eventuelle Veränderungen in distinkten Arealen quantifiziert werden. Auch sollte ein möglicher Einfluss der Knochenerkrankungen auf Zellmobilisierungen überprüft werden.

- **Analyse des Blutgefäßsystems im humanen Röhrenknochen**

Des Weiteren sollten strukturelle Analysen an humanen Knochen mittels bildgebender Verfahren wie der Magnetresonanztomographie (MRT) durchgeführt werden. Mit Hilfe dieser Daten sollten die identifizierten Strukturen im murinen System mit denen in humanen Röhrenknochen verglichen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller	Best.-Nr.
BD Discardit™ II Spritze, 20 ml	Becton, Dickinson and Company	300296
BD Discardit™ II Spritze, 5ml	Becton, Dickinson and Company	309050
BD Falcon™ Zellsieb 100 µm, aus Nylon	Becton, Dickinson and Company	352360
BD Microlane™ 3 Kanüle, 30G x 1/2 ", 0,3 mm x 13 mm	Becton, Dickinson and Company	304000
Cellstar® Tubes Reaktionsgefäß aus PP, konische Spitze, 15 ml	Greiner Bio-One GmbH	188271
Cellstar® Tubes Reaktionsgefäß aus PP, konische Spitze, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH	227261
Cryofilm Typ 2C(9)	Section-Lab Co. Ltd., JP	-----
DAPI Fluoromount-G® Eindeckmedium	Southern Biotech Inc.	0100-20
Deckgläser 24 x 24 mm	Carl Roth GmbH + Co. KG	H875
Cryomold® Einbettgeschälchen 25 x 20 x 5mm	Sakura® Finetek GmbH	4557
Einweg-Skalpelle steril, aus Edelstahl	mediware, servoprax GmbH	I10915

Produkt	Hersteller	Best.-Nr.
Introcan®-W Venenverweilkanüle mit Fixierflügeln, 22G, 0,90 x 25 mm	BRAUN GmbH	4254090B
Hämatokrit-Kapillaren Na-heparinisiert, 75 x 1,3 mm	A. Hartenstein GmbH	KAMI
Objektträger 26 x 76 mm	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH	11101
Omincan® F Einmal-Feindosierungsspritze mit integrierter Kanüle, 0,01-1 ml	BRAUN GmbH	9161502
Reaktionsgefäß aus PP, 1,5 ml	Sarstedt AG & Co.	72.690.001
Rotilabo®-Mikrotest-Platten, U-Profil	Carl Roth GmbH + Co. KG	9291.1
Rotlabo®-Reaktionsgefäße aus PP, schwarz, 5 ml	Carl Roth GmbH + Co. KG	PE69.1
Safe-Lock Eppendorf Tubes® Reaktionsgefäß mit Sicherheitsverschluss, 2 ml	Eppendorf AG	30.120.094
Safety-Multifly®-Kanüle, 21G, 200 mm lang	Sarstedt AG & Co.	851.638.235
Surgipath DB80 LX Premium-Schmalband Einwegklinge für harte Proben	Leica Biosystems	14035843496

2.1.2 Geräte

Gerät	Hersteller	Produktnr./Typ
Capnograph Type 340	Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus GmbH	14065
Cryostat	Thermo Fisher Scientific™ Inc.	Microm HM 560

Gerät	Hersteller	Produktnr./Typ
DREMEL® 300 (300-1/55)	Dremel Europe	F013030045
DREMEL® Biegsame Welle (255), 1070 mm	Dremel Europe	26150225JA
DREMEL® Korund-Schleifspitze (997), 3,4 mm	Dremel Europe	26150977JA
Fluovac Complete Anesthesia System Narkoseeinheit	Hugo Sachs Elektronik, Harvard Apparatus GmbH	72-6471
Konfokal- und Zwei-Photonen-Mikroskop	Leica Microsystems	TCS SP8
Lichtblattmikroskop	LaVision BioTec GmbH	UltraMikroskop
MACSMix™ Tube Rotator	Miltenyi Biotec GmbH	130-090-753
MACSQuant® VYB Durchflussszytometer	Miltenyi Biotec GmbH	130-096-116
Milli-Q Biopak® Polisher	Merck Millipore	CDUFBI001
MiniVent Type 845	Harvard Apparatus GmbH	121817
Univentor 400 Anesthesie-Einheit	ZEVENAAR Holland	8323001
Weitfeld Mikroskop	Leica Microsystems	DMI6000
Zentrifuge	Eppendorf AG	Centrifuge 5415 R

2.1.3 Chemikalien und Puffer

Produkt	Hersteller	Best.-Nr.
Dibenzylether	Sigma-Aldrich	33630-1L
Ethanol Rotipuran® [>99,8%], p.a.	Carl Roth GmbH + Co. KG	9065.4

Produkt	Hersteller	Best.-Nr.
Ethyl cinnamate, 3-Phenyl-2-propenoic acid ethyl Ester	Sigma-Aldrich	112371-100g
Forene® [100 % V/V] Isofluran (1-Chloro-2,2,2- trifluoroethyl-difluoromethylether)	Abbott GmbH & Co. KG	B506
G-CSF (Filgrastim) [30 mio I.E./0,5 ml]	Ratiopharm	L03AA02
Heparin [5000 U/ml]	Biochrom	L6510
Iso-Pentan	VWR PROLABO®	24.872.298
Isotone Natriumchloridlösung [0,9 %]	BRAUN	PZN 1957160
Ketamin [50 mg/ml]	Inresa	PZN 4089014
O.C.T.™ Compound	Sakura® Finetek GmbH	4583
Paraffinwachs	Sigma-Aldrich	76244
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich	P6148
PBS Dulbecco	Biochrom GmbH	L 182-10
Rompun [2 %], Xylazin	Apotheke	ceva
SeaPrep® Agarose Low gelling – low melting Agarose	Lonza	50302
Tween® 20	Carl Roth GmbH + Co. KG	9127.1
Ultrapure™ EDTA [0.5 M] pH 8.0	Invitrogen by life technologies	15575-038
Vaseline®	Sigma-Aldrich	16415

2.1.4 Antikörper, Isotypen und zirkulierende Fluoreszenzfarbstoffe

erkanntes Antigen	Trivialname	Kopplung	Klon	Konz. [mg/ml]	Hersteller	Best.-Nr.
CD31	PECAM-1	AF 594	MEC 13.3	0,5	Biolegend	102520
CD31	PECAM-1	AF 647	MEC 13.4	0,5	Biolegend	102516
CD45	Ly-5	PE-Cy7	30-F11	0,2	BD Biosciences	552848
Fluorescein Isothiocyanate-Dextran	FITC-Dextran	FITC	-----	70.000 mol wt	Sigma-Aldrich	FD40S-100MG
Gr-1	Ly-6G und Ly-6C	FITC	RB6-8C5	0,2	BD Biosciences	553127
Isotyp	-----	V450	A95-1	0,2	BD Biosciences	552849
Isotyp	-----	FITC	G235-2356	0,5	BD Biosciences	553953
Isotyp	-----	PE-Cy7	A95-1	0,2	BD Biosciences	552849
Ly-6G	-----	V450	1A8	0,5	BD Biosciences	560603
Qtracker® 655 vascular labels	-----	Quantum dot 655	-----	2 µM	Thermo Fisher Scientific™ Inc.	Q2102 1MP
Rhodamin B Isothiocyanat Dextran	RITC-Dextran	Rhodamin B	-----	70.000 mol wt	Sigma-Aldrich	R9379-100MG
Sca-1	Ly-6A/E	AF 647	E13-161.8	0,5	BD Biolegend	122518

2.2 Puffer/Lösungen

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung	
0,75 % Agarose	0,75 g	SeaPrep® Agarose mit deion. H ₂ O auf 100 ml auffüllen rührend auf einem Heizrührer erwärmen bis sich die Agarose vollständig gelöst hat
Antikörperlösung 1 CD31/PBS	10 µg/Maus (20 µl) 130 µl	CD31-AlexaFluor 647 [0,5 mg/ml] PBS
Antikörperlösung 2 CD31/Sca1/PBS	10 µg/Maus (20 µl) 10 µg/Maus (20 µl) 110 µl	CD31-AlexaFluor 594 [0,5 mg/ml] Sca1-AlexaFluor 647 [0,5 mg/ml] PBS
Antikörperlösung FACS CD45/Gr-1/Ly-6G	1:500 1:1000 1:500	Ly-6G V450 [0,5 mg/ml] Gr-1 FITC [0,2mg/ml] CD45 PE-Cy7 [0,2 mg/ml]
Heparin/PBS	100 U/Maus (20 µl) 80 µl	Heparin [5000 U/ml] PBS
Ethanol 50 % pH 9,0	50 ml 50 ml	Ethanol [>99,8%] deion. H ₂ O pH mit NaOH und HCl einstellen
Ethanol 70 % pH 9,0	70 ml 30 ml	Ethanol [>99,8%] deion. H ₂ O pH mit NaOH und HCl einstellen
Erythrozyten- Lysepuffer (10 x stock)	20,73 g 2,5 g 0,093 g	Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl) Kaliumbikarbonat (KHCO ₃) EDTA [0,5 M] mit deion. H ₂ O auf 250 ml auffüllen
Erythrozyten- Lysepuffer (1x)	15 ml	Erythrozyten-Lysepuffer (10 x stock) mit deion. H ₂ O auf 150 ml auffüllen

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung	
FITC-Dextran-Lösung	1,5 mg 1 ml	Fluorescein Isothio-Cyanate-Dextran PBS
Fixierungslösung 4 % PFA/PBS, pH 7,2	20 g 500 ml	Paraformaldehyd PBS pH mit NaOH und HCl einstellen
G-CSF/PBS 10 µg/kg Maus Narkoselösung Ketamin/Rompun	3,4 µl 97,6 µl 1 ml 4 ml 5 ml	G-CSF [30 mio I.E./0,5 ml] PBS Rompun [2 %] Ketamin [50 mg/ml] Natriumchloridlösung [0,9 %]
MACS Puffer	1 L 3,2 ml 10 ml	PBS EDTA [0,5 M] FCS
Paraffin-Vaseline- Gemisch (3:1)	12 g 4 g	Paraffinwachs Vaseline
Perfusionslösung EDTA/PBS	198 ml 2 ml	PBS EDTA [0,5 M]
Rhodamin-Dextran- Lösung	1,5 mg 1 ml	Rhodamine B Isothio-Cyanate- Dextran PBS
Qtracker-Lösung	10 µl 90 µl	Qtracker [®] 655 vascular labels [2 µM] PBS

2.3 Rechnergestützte Auswerteprogramme

Produkt	Version	Anbieter
ImageJ Image Processing and Analysis in Java	2006.02.01	Wayne Rasband Nationale Gesundheitsinstitute Ministerium für Gesundheitspflege und soziale Dienste der Vereinigten Staaten
Imaris	8.03.01	Bitplane Andor Technology Ltd.
MacsQuantify TM	2.5	Miltenyi Biotec GmbH

2.4 Methoden

2.4.1 Kurzzeitnarkose

Bei der Kurzzeitnarkose handelt es sich um eine Inhalationsnarkose, bei der Mäuse einzeln in die Fluovac Narkoseeinheit gesetzt und individuell mit einem Gemisch aus reinem Sauerstoff und 1,2 bis 1,4 % Isofluran narkotisiert werden.

2.4.2 Allgemeinnarkose

Zur ein- bis zweistündigen Allgemeinnarkose von Mäusen erhalten diese individuell auf ihr Körpergewicht (KGW) abgestimmt die Ketamin/Rompun-basierte Narkoselösung über eine Einmal-Feindosierungsspritze mittels intraperitonealer (i.p.) Injektion, wobei die Dosis von Ketamin bei 100 mg/kg KGW und Rompun bei 10 mg/kg KGW liegt.

2.4.3 Langzeitnarkose

Zur Langzeitnarkose werden die Mäuse mittels der Allgemeinnarkose narkotisiert, um dann eine Intubationsnarkose zu erhalten. Die Intubation erfolgt mittels einer Venenverweilkanüle, die an den MiniVent Typ 845 angeschlossen wird. Dieser ist mit der Univentor 400 Anästhesie-Einheit verbunden, die ein Gemisch aus reinem Sauerstoff und 1,2 % Isofluran generiert und an den MiniVent weiterleitet. Dieser beatmet die Maus mit einem Hubvolumen von etwa 250 µl und einer Frequenz von 200 Beatmungshüben/Minute. Der Kohlendioxidgehalt der respiratorischen Gase wird während

der gesamten Langzeitnarkose anhand des Capnographen Typ 340 überwacht, so dass die Beatmung der Maus hinsichtlich der optimalen Narkosetiefe und Sauerstoffversorgung individuell angepasst werden kann.

2.4.4 G-CSF Mobilisierung zur durchflusszytometrischen Analyse

Zur Aktivierung und Rekrutierung von PMNs aus dem Knochenmark in die allgemeine Blutzirkulation werden die Mäuse mittels Kurzzeitnarkose betäubt und erhalten individuell auf ihr Körpergewicht abgestimmt 10 µg/kg KGW G-CSF gelöst in 100 µl PBS mittels intravenöser (i.v.) Injektion mit einer Einmal-Feindosierungsspritze in den retrobulbären Venenplexus. Kontrolltieren werden 100 µl PBS mit einer Einmal-Feindosierungsspritze i.v. in den retrobulbären Venenplexus injiziert.

Zu definierten Zeitpunkten (2 oder 3 Stunden nach Injektion) werden die Tiere schmerzlos mittels CO₂-Begasung getötet. Über eine Hämatokrit-Kapillare werden jeweils etwa 75 µl Blut aus dem retrobulbären Venenplexus entnommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß, das 20 µl Heparin zur Unterbindung der Blutgerinnung enthält, überführt. Das Blut-Heparin-Gemisch wird jeweils in eine Vertiefung einer Mikrottest-Platte mit U-Profil überführt und mit 200 µl (1x) Erythrozyten-Lysepuffer vermischt. Die Proben werden daraufhin für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und dann 5 min bei RT mit 1500 Umdrehungen pro Minute (engl.: rotations per minute, rpm) abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 200 µl (1x) Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert. Die Inkubation und Zentrifugation werden noch zwei weitere Male durchgeführt. Nach der letzten Zentrifugation wird das Pellet in 200 µl PBS resuspendiert und erneut für 5 min bei RT mit 1500 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird erneut verworfen und das Pellet in 80 µl FACS-Antikörperlösung resuspendiert. Die Proben werden für 15 min im Dunkeln bei RT inkubiert und dann jeweils mit 200 µl PBS versetzt. Es erfolgt eine weitere Zentrifugation für 5 min bei RT mit 1500 rpm. Der Überstand wird verworfen und das Pellet jeder U-Profil-Vertiefung wird jeweils in 200 µl MACS-Puffer resuspendiert.

Neben den Blutproben werden den Mäusen auch Knochenmarksproben zur durchflusszytometrischen Analyse entnommen. Dazu wird jeweils ein Femur pro Maus entnommen, von dem umliegenden Muskelgewebe befreit und mittels einer 30G x 1/2 " Kanüle, an die eine 5 ml Spritze mit PBS angeschlossen ist, aus dem Knochenmark in ein 15 ml Reaktionsgefäß, in dem 5 ml PBS vorgelegt sind, ausgespült. Durch mehrmaliges Aufziehen der Spritze wird eine Einzelzellsuspension generiert, die nun 5 min

bei RT mit 1500 rpm abzentrifugiert wird. Der Überstand wird verworfen, während das Pellet in 1 ml (1x) Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert, in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und 5 min bei RT inkubiert wird. Durch Zugabe von 40 ml PBS wird die Reaktion abgestoppt und die Zellsuspension über ein 100 µm Zellsieb in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgt eine weitere Zentrifugation von 5 min bei RT mit 1500 rpm, woraufhin der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert wird. Von dieser 1 ml Zellsuspension werden 200 µl in eine Vertiefung einer Mikrotiter-Platte mit U-Profil überführt und diese erneut für 5 min bei RT mit 1500 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 80 µl FACS-Antikörperlösung resuspendiert. Die Proben werden nun für 15 min im Dunkeln bei RT inkubiert und dann jeweils mit 200 µl PBS aufgefüllt. Nach einer erneuten Zentrifugation für 5 min bei RT mit 1500 rpm wird der Überstand verworfen und das Pellet in 200 µl MACS-Puffer resuspendiert.

Die durchflusszytometrischen Messungen erfolgen mit dem MACSQuant[®] VYB Durchflusszytometer und die Datenauswertungen mittel des rechnergestützten Auswerteprogramms MACSQuantify.

2.4.5 Induktion der nephrotoxischen Serum-Nephritis

Zur Induktion der nephrotoxischen Serum-Nephritis (NTN) in 8-12 Wochen alten weiblichen C57BL/6J Mäusen wird nephrotoxisches Schafserum verwendet. Dazu werden den zu behandelnden Mäusen über ein Woche täglich 350 µl des Schafserums i.p. mit einer Einmal-Feindosierungsspritze appliziert. Über den gesamten Versuchszeitraum wird der jeweilige Urin pro Tier pro Tag gesammelt und hinsichtlich seiner Albumin und Kreatinin-Level analysiert. Die Organproben wurden an Tag 7 und Tag 14 nach Induktion der NTN wie unter Punkt 1.4.7 und 1.4.10 beschrieben generiert.

2.4.6 Induktion der rheumatischen Arthritis

Zur Induktion der rheumatischen Arthritis mittels Glucose-6-Phosphat Isomerase (G6PI) und Freund-Adjuvans (engl.: complete freund's adjuvant, CFA) werden 8-12 Wochen alte männliche und weibliche DBA/1 DREG Mäuse verwendet. Die FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen wurden durch die i.p.-Injektion von 0,5 µg Diphtherietoxin 48 und 24 Stunden vor Induktion der Arthritis, so wie an Tag 4 und Tag 5 nach Induktion der Arthritis in den DBA/1 DREG Mäusen depletiert. Daraufhin wurden die Versuchstiere in drei Gruppen aufgeteilt: eine PBS/PBS Kontrollgruppe, eine PBS/CFA

Mock-Gruppe und die G6PI/CFA Arthritis-Gruppe. Den Versuchsgruppen wurden jeweils 400 µl der entsprechenden Immunisierungslösungen subkutan (s.c.) an der Schwanzwurzel appliziert. Der Krankheitsverlauf wurde durch die tägliche Bewertung äußerer Krankheitsparameter, wie Rötungen und Schwellungen an den Fußgelenken kontrolliert. Die Tiere wurden an Tag 14, Tag 28 und Tag 62 nach Induktion der Arthritis schmerzlos per CO₂ getötet und anschließend perfundiert. Die Organproben wurden an Tag 14, Tag 28 und Tag 62 nach Induktion der rheumatischen Arthritis wie unter Punkt 1.4.7 und 1.4.10 beschrieben generiert.

2.4.7 Intravitale Blutgefäßfärbung und Perfusionsfixierung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die intravitale Antikörper-basierte Färbung von Blutgefäßen etabliert. Dabei wird die zu behandelnde Maus mittels Kurzzealnarkose betäubt. Je nach Fragestellung erfolgt die i.v. Injektion von 100 µl der Antikörperlösung 1 oder 2 über eine Einmal-Feindosierungsspritze in den retrobulbären Venenplexus. 20 min nach der Injektion werden die Tiere schmerzlos mittels CO₂ getötet. Zur Entfernung von Erythrozyten und ungebundenen Antikörpern aus der Zirkulation werden die Mäuse mit 15 ml kaltem EDTA/PBS über eine 21 G Kanüle kardiovaskulär perfundiert (Abbildung 12). Die erfolgreiche Perfusion zeigt sich durch die Ausbleichung der Leber und der Nieren. Anschließend erfolgt eine Perfusionsfixierung über dieselbe Route mit 15 ml kalter Fixierungslösung. Anschließend werden Femur- und Tibiaknochen mit dem umliegenden Muskelgewebe entnommen und in ein 15 ml Reaktionsgefäß mit ca. 5 ml Fixierungslösung überführt und für weitere 4 Stunden bei 4-8 °C im Dunkeln inkubiert. Daraufhin werden die Proben in PBS überführt und können für verschiedene Anwendungszwecke, wie zur histologische Probengenerierung oder zur Optimierung der optischen Durchlässigkeit, weiterverarbeitet werden.

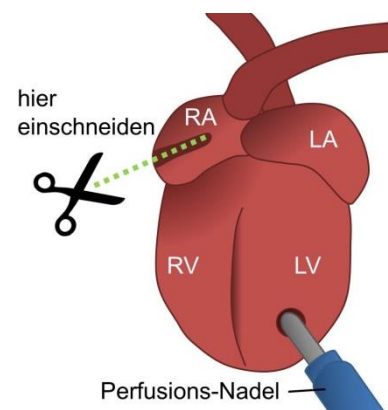


Abb. 12: Perfusionsschema

Während das rechte Atrium (RA) eröffnet wird (grüne gestrichelte Linie), erfolgt die Injektion mit der Perfusionsnadel in den linken Ventrikel (LV). Somit wird der Körperkreislauf gespült und das Blut kann am RA austreten. Das linke Atrium (LA) und der rechte Ventrikel (RV) bleiben bei der Perfusion unangetastet.

2.4.8 Histologische Knochenschnitte

Zur Anfertigung von histologischen Cryomold-Präparaten werden mittels intravitale Blutgefäßfärbung und anschließender Perfusionsfixierung generierte Proben verwen-

det. Nach der Fixierung der entnommenen Femur- und Tibiaknochen erfolgt die Probeneinbettung in O.C.T.TM Compound (Cryomold). Dazu wird ein Becherglas aus Polypropylen mit ca. 10 ml Iso-Pentan gefüllt und in ein Sicherheitsbehältnis mit Flüssigstickstoff gehangen, bis das Iso-Pentan gefroren ist. Jeweils ein Einbettschälchen pro Probe wird mit Cryomold befüllt und der Knochen in dem Einbettschälchen so positioniert, dass er vollständig von dem Cryomold bedeckt ist. Das Einbettschälchen wird nun in dem Becherglas auf dem gefrorenen Iso-Pentan positioniert und dieses erneut in den Flüssigstickstoff gehangen. Wenn das Cryomold vollständig gefroren ist, kann die Einbettkassette entnommen und bei -80 °C gelagert werden.

Zur Anfertigung von histologischen Schnitten wird ein Microm HM 560 Cryostat verwendet, wobei die Schnitttemperatur auf -20 °C und die Schnittdicke auf 10 µm festgelegt sind. Zum Schneiden der Knochenproben werden Surgipath DB80 LX Premium-Schmalband Einwegklingen für harte Proben verwendet. Jeweils ein Gewebeschnitt wird auf ein größenangepasstes Stück Cryofilm Typ 2C(9) gezogen und mit dem Gewebeschnitt nach oben orientiert auf einem Objektträger platziert. Mit deionisiertem Wasser wird das überschüssige Cryomold vorsichtig von dem Cryofilm abgewaschen. Die Proben werden dann für wenige Minuten bei RT getrocknet und anschließend mit dem Eindeckmedium DAPI Fluoromount-G[®] bedeckt und mit einem Deckglas abgedeckt. Dieses enthält 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), welches die DNS in den Proben fluoreszent markiert.

Die Proben werden nun bei RT im Dunkeln getrocknet, bis das Eindeckmedium vollständig ausgehärtet ist, und können auch weiterhin im Dunkeln bei RT gelagert werden.

Die Mikroskopie der histologischen Präparate erfolgt wahlweise mit dem Weitfeld Mikroskop DMI6000 oder mit dem Konfokal- und Zwei-Photonen-Mikroskop TCS SP8. Die generierten Daten werden mit den Programmen ImageJ und Imaris bearbeitet und analysiert.

2.4.9 Optimierung der optischen Durchlässigkeit von weichen Geweben

Zur Optimierung der optischen Durchlässigkeit werden PFA-fixierte Proben, die mittels der intravitalen Antikörperfärbung und Perfusionsfixierung generiert wurden, verwendet. Nach der Perfusionsfixierung werden weiche Organe, wie das Herz, die Niere und die Lunge für zwei Stunden bei 4-8 °C in 4 % PFA/PBS nachfixiert.

Da die Lunge bei der Probengenerierung kollabiert wird diese mit 0,75 %iger SeaPrepTM Agarose gefüllt. Dazu wird diese in deionisiertem Wasser gelöst, woraufhin 800 µl der noch flüssigen Agarose über eine Omincan[®] F Einmal-Feindosierungsspritze in die Lunge appliziert werden. Die Trachea der Lunge wird abgeklemmt, so dass die Agarose nicht wieder austreten kann und das Organ wird in ein Eiswasserbad überführt. Nachdem die Agarose in der Lunge ausgehärtet ist, wird diese in ein schwarzes 5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Dehydrierung der Lunge wird diese in dem schwarzen Reaktionsgefäß für jeweils 4 Stunden bei 4-8 °C im Kühlschrank in 50 % Ethanol (pH = 9,0), 70 % Ethanol (pH = 9,0) und zwei Mal in 100 % Ethanol inkubiert. Die Proben werden während der gesamten Inkubationszeit mittels des MACSMixTM Tube Rotators leicht geschüttelt. Anschließend an die Dehydrierung folgt die Anpassung des RIs mittels ECI bei Raumtemperatur. Die Inkubationszeit der Lunge beträgt etwa 30 min bis das Organ vollständig transparent erscheint.

Andere weiche Organe, wie das Herz und die Niere behalten bei der Probengenerierung ihre physiologische Form und müssen nicht mit Agarose behandelt werden. Daher werden diese nach der Perfusion für 4 Stunden bei 4-8 °C nachfixiert. Anschließend erfolgt die Dehydrierung, die in ihren Abläufen und Inkubationszeiten denen der Lungenpräparation entspricht. Die Anpassung der RIs bis zur Erreichung der Organtransparenz benötigt sowohl für murine Herzen als auch Nieren eine Inkubationszeit von zwei Stunden bei Raumtemperatur.

Die so generierten Proben können für verschiedene mikroskopische Verfahren wie die konfokale Mikroskopie, die Zwei-Photonen-Mikroskopie oder die Lichtblattmikroskopie genutzt werden.

2.4.10 Optimierung der optischen Durchlässigkeit von murinen Knochen

Zur Optimierung der optischen Durchlässigkeit werden PFA-fixierte Proben, die mittels der intravitalen Antikörperfärbung und Perfusionsfixierung generiert wurden, verwendet. Um die Knochenoberfläche nicht zu beschädigen, wird das umliegende Gewebe vorsichtig mittels Pinzetten von den Knochen entfernt.

Die präparierten Knochen werden nun in schwarze 5 ml Reaktionsgefäße überführt, die mit 50 % Ethanol (pH = 9,0) aufgefüllt werden. Die Proben werden mittels des MACSMixTM Tube Rotators bei 4-8 °C leicht schüttelnd für 12 Stunden inkubiert. Die 50 %ige Ethanollösung wird anschließend verworfen und das 5 ml Reaktionsgefäß mit

70 % Ethanol (pH = 9,0) befüllt. Es erfolgt eine weitere 12 stündige Inkubation bei 4-8 °C, wobei die Proben leicht geschüttelt werden. Anschließend wird das 70 %ige Ethanol verworfen und das 5 ml Reaktionsgefäß mit >99,8 % Ethanol aufgefüllt. Es erfolgt eine weitere 12 stündige Inkubation bei 4-8 °C, bei der die Proben auch weiterhin leicht geschüttelt werden. Dieser Schritt wird einmal wiederholt, so dass die Proben insgesamt für 24 Stunden in >99,8 % Ethanol dehydriert werden. Abschließend werden die Proben in Zimtsäureethylester (engl.: Ethyl cinnamate, ECi) überführt und bei RT so lange schüttelnd inkubiert bis die Proben durchsichtig werden.

Die so generierten Proben können für verschiedene mikroskopische Verfahren wie die konfokale Mikroskopie, die Zwei-Photonen-Mikroskopie oder die Lichtblattmikroskopie genutzt werden.

2.4.11 Lichtblattmikroskopie optisch geclearter Proben

Zur mikroskopischen Untersuchung ganzer Organe wird das Lichtblattmikroskop „UltraMikroskop“ der Firma LaVisionBioTec genutzt. Dieses verfügt über ein Olympus MVX10 Mikroskopstativ mit einem LVBT Laser-Modul, eine sCMOS Kamera mit einer Pixelgröße von $6,5 \times 6,5 \mu\text{m}^2$ und Detektionsoptiken, die eine numerische Apertur von 0,5 aufweisen und eine 1,26- bis 12,6-fache optische Vergrößerung ermöglichen.

Zur Exzitation von EYFP, EGFP oder autofluoreszenten Gewebesignalen wird ein bei 488 nm Wellenlänge optisch gepumpter Halbleiterlaser (engl.: Optically Pumped Semiconductor Laser, OPSL) genutzt. Zur Anregung des Fluoreszenzproteins tdTomato und des Fluoreszenzfarbstoffes AlexaFluor 594 wird ein OPSL mit einer spezifischen Exzitationswellenlänge von 561 nm genutzt und für langwellige Fluoreszenzmoleküle wie AlexaFluor 647 wird ein Dioden-Laser, der Licht mit einer Wellenlänge von 647 nm freisetzt, verwendet. Die freigesetzten Fluoreszenzsignale werden über spezifische optische Filter detektiert. So werden Bandbreitenfilter von 525/50 nm für EGFP, 545/30 nm für EYFP, 595/40 nm für tdTomato, 620/60 nm für AlexaFluor 594- und 680/30 nm für AlexaFluor 647-gekoppelte Antikörper genutzt. Da die Exzitations-Optiken des Mikroskops eine Lichtblattdicke von 5 bis 40 μm ermöglichen, werden zur optimalen Auflösung in der z-Achse alle Proben mit z-Abständen von 5 μm mikroskopiert.

Die generierten Daten werden mit den Programmen ImageJ und Imaris bearbeitet und analysiert.

2.4.12 Konfokale und Zwei-Photonen-Mikroskopie optisch geclearter Proben

Zur Mikroskopie optisch geklärter Proben mittels des TCS SP8 Konfokal- und Zwei-Photonen-Mikroskops von Leica Microsystems müssen diese in Mikroskopiekammern eingebettet werden. Das zur Optimierung der optischen Durchlässigkeit verwendete ECI stellt eine hydrophobe Flüssigkeit dar, während es sich bei dem hier verwendeten Objektiv des TCS SP8 um ein Wasser-Tauchobjektiv handelt. Darüber hinaus ist das ECI-basierte Verfahren reversibel, was bei Kontakt der Proben mit Wasser in einer Wiederherstellung der Blickdichtigkeit resultiert. Daher wird hier eine Mikroskopiekammer benötigt, die das hydrophobe ECI von dem für das Objektiv benötigte Wasser separiert. Aufgrund der Größe der Proben wird ein Einbettgeschälchen verwendet, die mit dem Paraffin-Vaseline-Gemisch gefüllt wird, bis der zu mikroskopierende Knochen etwas über den Rand des Einbettgeschälchens hinaussteht. Dazu wird Paraffin-Vaseline-Gemisch soweit erhitzt, bis es sich verflüssigt. Bei RT härtet dieses zügig wieder aus, so dass sich nach kurzer Zeit ein fester Boden in dem Einbettgeschälchen ausbildet. Mit dem Paraffin-Vaseline-Gemisch wird nun ein Rahmen um die Probe

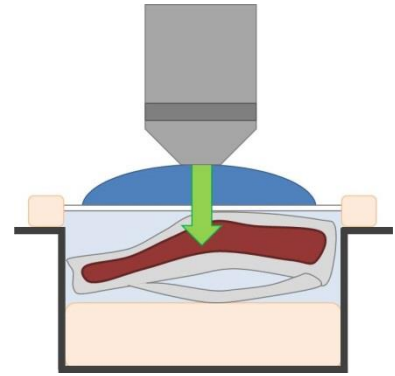


Abb. 13: Schematischer Aufbau der Mikroskopiekammer für optisch geklärte Proben

Eine Einbettkassette (dunkelgrau) wird mit einem Paraffin-Wachs-Gemisch (beige) soweit gefüllt, dass der zu mikroskopierende Knochen etwas aus der Einbettkassette übersteht. Mit dem Paraffin-Wachs-Gemisch wird ein Rahmen auf der Einbettkassette gebildet, auf dem ein Deckglas (weiß) positioniert wird. Der Zwischenraum zwischen dem Deckglas und der Einbettkassette wird mit ECI (hellblau) gefüllt und diese dann mit Paraffin-Wachs versiegelt. Nun wird ein Wassertropfen (dunkelblau) auf das Deckglas gegeben, das als Immersionsmedium für das verwendete Wassertauchobjektiv (grau) dient. So kann das Exzitationslicht (grüner Pfeil) über den Wassertropfen und das Deckglas in die Probe eindringen, ohne dass das Objektiv in Kontakt mit dem ECI gelangt.

herum aufgeschichtet, der mit einem Deckglas abgedeckt wird. An drei Seiten wird das Deckglas mittels des Paraffin-Vaseline-Gemisches versiegelt. Über die eine noch offene Seite, die einen Zwischenraum zwischen dem Deckglas und dem Paraffin-Vaseline-Rahmen bildet, wird die Einbettkassette mit ECI befüllt. Anschließend wird auch diese Seite mit dem Paraffin-Wachs-Gemisch verschlossen. Nun kann auf das Deckglas ein Wassertropfen gegeben werden, der als Immersionsmedium für das verwendete 25 x HCX IRAPO L Wasser-Tauchobjektiv mit einer NA von 0,95 dient (Abbildung 13).

Zur Anregung der AlexaFluor 594-gefärbten Strukturen wird ein 20 mW starker, bei 561 nm Wellenlänge Dioden-gepumpter Festkörperlaser (engl.: Diode Pumped Solid State Laser, DPSSL) genutzt, während für die AlexaFluor 647-gefärbten Struktu-

ren ein 10 mW starker Helium-Neon-Laser, der eine spezifische Exzitations-strahlung bei 633 nm Wellenlänge generiert, verwendet wird.

Mittels sequentieller Anregung kann neben der Konfokalen Mikroskopie auch eine Zwei-Photonen-Anregung der Proben erfolgen. Dabei wird der Effekt der Frequenzverdoppelung zur Generierung von so genannten SHG-Signalen (engl.: second harmonic generation) zur Darstellung des kompakten Knochens genutzt.

Die so generierten Daten werden mit den Programmen ImageJ und Imaris bearbeitet und analysiert.

2.4.13 Intra-vitale Zwei-Photonenmikroskopie im Knochenmark

Zur intra-vitalen Untersuchung der G-CSF vermittelten Zellrekrutierung aus dem Knochenmark werden die zu mikroskopierenden Mäuse mittels Langzeitnarkose betäubt. Wie bereits beschrieben wird die Haut am Schienbein vorsichtig mit einem Edelstahl Einweg-Skalpell eröffnet und der kompakte Knochen der Tibia mit einer Korund-Schleifspitze, die an den DREMEL[®] 300 (300-1/55) angeschlossen ist, auf eine Dicke von 50 µm ausgedünnt⁷⁶. Je nach Mausmodell erhält das narkotisierte Tier 100 µl FITC-Dextran-Lösung, Rhodamin-Dextran-Lösung oder Qtracker-Lösung mittels einer Einmal-Feindosierungsspritze i.v. in den retrobulbären Plexus. Somit kann der Blutfluss im Knochenmark visualisiert werden. Die Maus wird nun in einem bereits beschriebenen Wasserbad, welches auf 37 °C temperiertes PBS enthält, platziert, so dass die präparierte Tibia vollständig mit dem PBS bedeckt ist⁷⁶. Das Wasserbad wird direkt unter dem 25 x HCX IRAPO L Wasser-Tauchobjektiv, das eine NA von 0,95 aufweist, des TCS SP8 Konfokal- und Zwei-Photonen-Mikroskops von Leica Microsystems platziert. Zur Anregung der Fluoreszenzsignale wird ein „Chameleon Vison II“ Laser der Firma Coherent[®] Inc., bei dem es sich um einen gepulsten Titan-Saphir-Laser handelt, eingesetzt. Dieser kann individuell in seiner Exzitationswellenlänge angepasst werden und umfasst einen spektralen Bereich von 680 nm bis 1080 nm Wellenlänge. Dabei liefert er mit über 2,8 Watt bei 800 nm Wellenlänge eine sehr hohe Exzitationsleistung. Abhängig von dem verwendeten Mausmodell und den emittierten Fluoreszenzsignalen werden individuelle Bandbreitenfilter-Kombinationen zur Detektion verwendet. Grundsätzlich werden im Rahmen dieser Doktorarbeit zwei externe (engl.: non-descanned) Hybrid-Detektoren (HyDs) und zwei externe Photoelektronenvervielfacher (engl.: photomultiplier, PMT) zur Detektion der Fluoreszenzsignale bei der intra-vitalen Zwei-Photonen-mikroskopie genutzt (Abbildung 14).

Etwa ein halbe Stunde nach Beginn der intra-vitalen Zwei-Photonenmikroskopie des Blutflusses im Knochenmark wird der Maus 10 µg/kg Maus G-CSF/PBS mit einer Einmal-Feindosierungsspritze i.v. in den retrobulbären Plexus des noch nicht zur Injektion verwendeten Auges injiziert. Die Aktivierung und Mobilisierung der PMNs wird nun für weitere drei Stunden *in vivo* mikroskopiert. Es handelt sich hier um einen Finalversuch, weshalb das Tier nach Beendigung der Aufnahmen noch unter Narkose schmerzfrei getötet wird.

Die generierten Daten werden mittels der rechnergestützten Programme ImageJ und Imaris bearbeitet und analysiert.

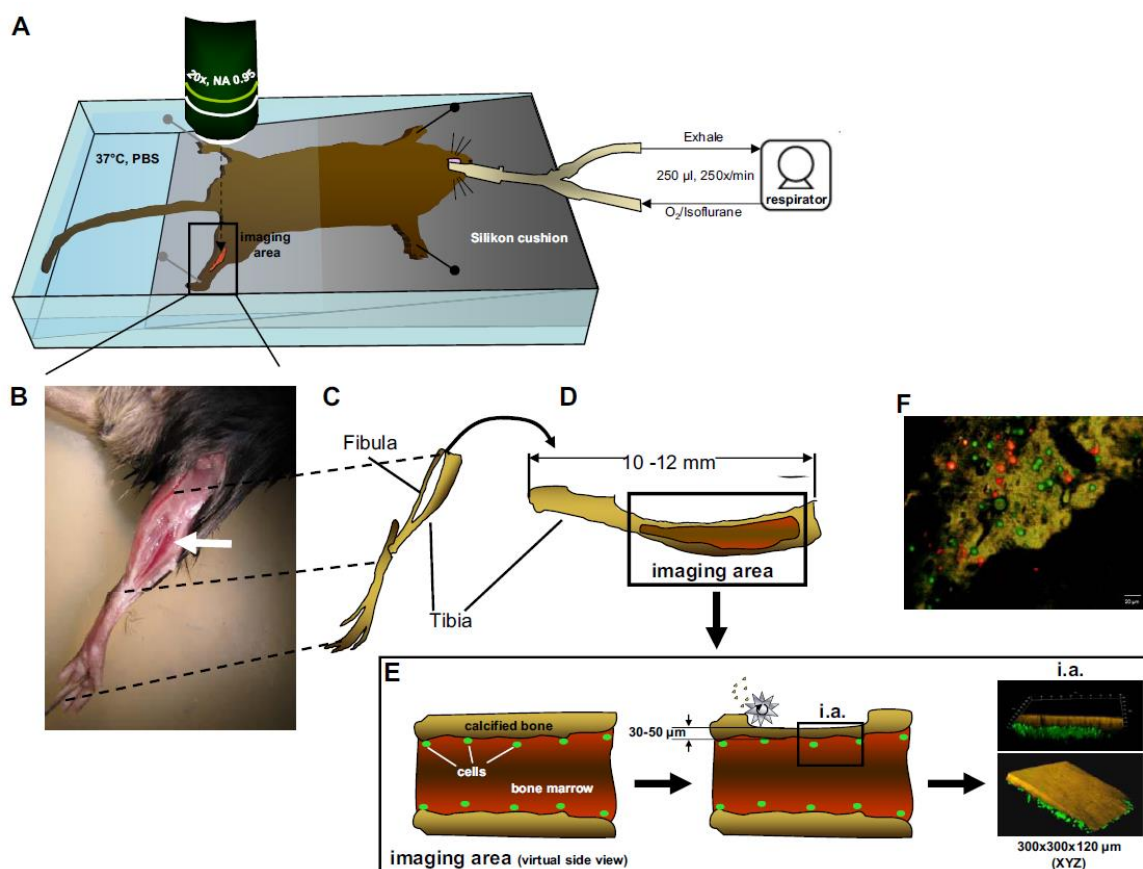


Abb. 14: Aufbau der intra-vitalen Zwei-Photonen-Mikroskopie des tibialen Knochenmarks

(A) Die über eine Intubationsnarkose betäubte Maus wird in einem auf 37 °C temperiertem Wasserbad, das mit PBS gefüllt ist positioniert. (B) Der kompakte Knochen der Tibia wird soweit ausgedünnt, bis das Knochenmark rötlich durch den kompakten Knochen durchscheint (weißer Pfeil). (C,D) Schematische Graphik zur Orientierung des Knochens und des ausgedünnten Knochenareals. (E) Mit Hilfe eines Schleifwerkzeugs wird der kompakte Knochen auf eine Dicke von 30 bis 50 µm reduziert, was die Visualisierung von Zellen (grüne Punkte) und anderen Strukturen am Endost ermöglicht. (F) Beispielhafte Darstellung von Immunzellen (grün und rot) am endostalen kompakten Knochen (braun).⁷⁶

2.4.14 Intra-vitale Zwei-Photonenmikroskopie des Periosts

Zur intra-vitalen Untersuchung des Periosts mittel Zwei-Photonenmikroskopie werden die zu mikroskopierenden Mäuse mittels Langzeitnarkose betäubt.

Mit einem sterilen Edelstahl Einweg-Skalpell wird die Haut am Schienbein vorsichtig, eröffnet, ohne umliegende Gefäße oder das Periost zu beschädigen. Die frei präparierte Haut wird mit Stecknadeln an der Präparationsmatte fixiert. Zur Visualisierung des Blutflusses erhalten die Tiere je nach Mausmodell jeweils 100 µl FITC-Dextran-Lösung, Rhodamin-Dextran-Lösung oder Qtracker-Lösung, die mit 100 U/Maus Heparin versetzt sind, mittels einer Einmal-Feindosierungskanüle i.v. in den retrobulbären Plexus. Das Heparin gewährleistet hier die Langzeitdurchblutung kleiner Kapillaren, die sonst aufgrund des Narkose-induzierten Blutdruckabfalls kollabieren würden.

Die Maus wird wie unter Punkt 1.3.10 in einem Wasserbad, bei dem das zu mikroskopierende Bein von 37 °C warmen PBS bedeckt wird, positioniert. Das Wasserbad wird ebenso in dem Zwei-Photonenmikroskop positioniert und die Maus so lange wie möglich mikroskopiert. Es handelt sich hier ebenfalls um einen Finalversuch, weshalb das Tier nach Beendigung der Aufnahmen noch unter Narkose schmerzfrei getötet wird.

Die generierten Daten werden mittels der rechnergestützten Programme ImageJ und Imaris bearbeitet und analysiert.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung eines Verfahrens zur Optimierung der optischen Durchlässigkeit von murinen Organen

3.1.1 Identifizierung geeigneter Reagenzien zur Optimierung der optischen Durchlässigkeit

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte ein Verfahren zur Optimierung der optischen Durchlässigkeit (engl.: clearing) von murinen Knochen entwickelt werden, welches neben dem Erhalt endogener Fluoreszenzproteine auch die Färbung von definierten Strukturen mittels fluoreszent markierter Antikörper ermöglicht.

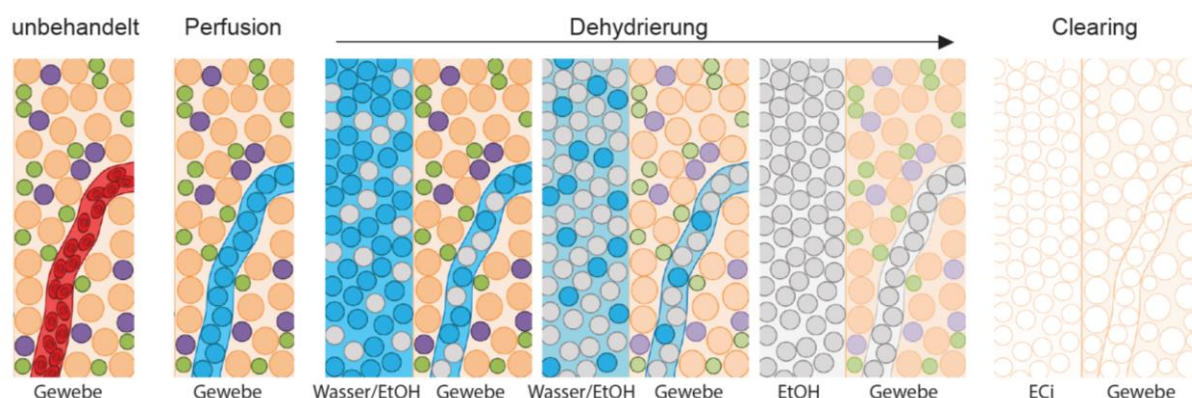
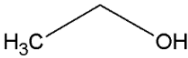





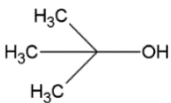


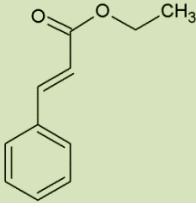
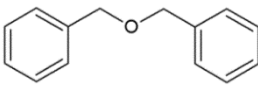

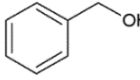

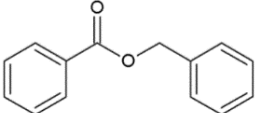


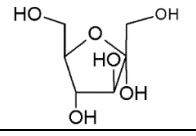
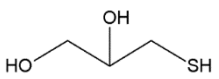



Abb. 15: Schematischer Ablauf der Optimierung der optischen Durchlässigkeit mittels Ethanol und ECi

Biologische Gewebe setzen sich aus einer Vielzahl an Zellen (beige, lila, grün) mit individuellen refraktiven Indices (RIs) zusammen. Mittels einer EDTA/PBS (blau) Perfusion wird das Blut (rot) aus dem Gewebe entfernt und durch die anschließende Perfusion mittels PFA wird das Gewebe fixiert. Anschließend wird das Gewebe in eine wässrige Lösung überführt, wo mittels einer aufsteigenden Ethanolreihe (EtOH, grau) die Dehydrierung erfolgt. Bei diesem Prozess verändern sich aufgrund des Wasserentzugs auch die jeweiligen RIs der in dem Gewebe enthaltenen Zellen (hellbeige, helllila, hellgrün). Nach der vollständigen Entfernung des Wassers wird das Gewebe in ECi inkubiert, wobei das Ethanol durch das Clearing-Reagenz verdrängt wird und die Homogenisierung der verschiedenen RIs erfolgt (weiße Strukturen). Das Gewebe erscheint daraufhin transparent.

Es wurden verschiedene bereits publizierte Verfahren zur Optimierung der optischen Durchlässigkeit getestet, die alle entweder für die Anpassung des RIs von Knochen ungeeignet waren oder gesundheitsgefährdende, toxische oder potentiell explosive Reagenzien nutzten. Als geeignetes Reagenz für die Optimierung der optischen Durchlässigkeit von weichen und harten Organen wurde daraufhin im Rahmen dieser Doktorarbeit Zimtsäureethylester (engl.: Ethyl cinnamate, ECi) identifiziert und zum Patent angemeldet^{107,108}. Diese aromatische Verbindung weist keinerlei Gesundheitsgefährdungen und einen RI von 1,561 auf, der dem von murinen Knochen entspricht (Tabelle 1).

Tab. 1: Chemische Strukturen und molekulare Eigenschaften gängiger Dehydrierungs-Reagenzien und organischer Clearing-Reagenzien

	Struktur	Name	Synonym	Eigenschaften	Sicherheitshinweise
Dehydrierungs-Reagenzien		Ethanol		MF = C ₂ H ₆ O RI (nD20) = 1.360	 Achtung H225-H319 P210-P280-P305 + P351 + P338-P337 + P313-P403 + P235
		Tetrahydrofuran	THF	MF = C ₄ H ₈ O RI (nD20) = 1.407	   Gefahr H225-H319-H335-H351 P210-P261-P281-P305 + P351 + P338 Kann explosive Peroxide bilden!
		Tert-Butanol		MF = C ₄ H ₁₀ O RI (nD20) = 1.394	  Gefahr H225-H319-H332-H335 P210-P261-P305 + P351 + P338
Clearing-Reagenzien		Zimtsäure-ethylester <i>ethyl (2E)-3-phenylprop-2-enoate</i>	ECi	MF = C ₁₁ H ₁₂ O RI (nD20) = 1.558	
		Di-Benzylether	DBE	MF = C ₁₄ H ₁₄ O RI (nD20) = 1.561	 Achtung H335-H410 P273-P304 + P340 + P312- P391-P501
		Benzyl Alkohol <i>phenylmethanol</i>	BABB	MF = C ₇ H ₈ O RI (nD20) = 1.539	 Achtung H302 + H332-H319 P261-P301 + P312 + P330- P304 + P340 + P312-P305 + P351 + P338
		Benzyl Benzoat		MF = C ₁₄ H ₁₂ O ₂ RI (nD20) = 1.568	  Achtung H302-H411 P273
		Fructose	SeeDB	MF = C ₆ H ₁₂ O ₆ RI (nD20) = 1.616	
		1-Thioglycerol		MF = C ₃ H ₈ O ₂ S RI (nD20) = 1.526	 Achtung H302-H311-H315-H319-H335 P261-P280-P305 + P351 + P338-P312



entzündlich



Gesundheitsschädlich
(akute Toxizität Kat. 4)
STOT* Kat. 3
ätzend Kat. 2
hautsensibilisierend



krebserzeugend
mutagen
reproduktionstoxisch
STOT* Kat. 1 und 2
Atemwegssensibilisie-
rend



umweltgefährlich



giftig
(akute Toxizität
Kat. 1, 2 und 3)

Dieses Reagenz wird in Verbindung mit einer Gewebe-dehydrierung zur Optimierung der optischen Durchlässigkeit verwendet. Als geeignetes Dehydrierungsreagenz wurde Ethanol identifiziert und in aufsteigender Konzentration zur Dehydrierung von weichen und harten Organen verwendet (Abbildung 15).

Um den Erhalt von endogen exprimierten Fluoreszenzmolekülen zu optimieren, wurden bei dem hier etablierten Verfahren die pH-Werte des zur Dehydrierung verwendeten Ethanols berücksichtigt und angepasst, wobei ein stark basischer pH von 9,0 verwendet wurde.

3.1.2 Anwendung des Ethanol-ECi-Verfahrens bei weichen Organen in Kombination mit Antikörperfärbungen

Um die Optimierung der optischen Durchlässigkeit mittels des im Rahmen dieser Doktorarbeit entwickelten Verfahrens zu überprüfen wurden zunächst weiche Organe getestet. Die weiche Beschaffenheit der Organe, die durch den hohen Wasseranteil bedingt ist, ermöglicht eine einfachere Penetration der verwendeten Reagenzien durch das Gewebe und somit höhere Erfolgchancen hinsichtlich der zu erzielenden Transparenz. Es wurden Herzen, Nieren und Lungen wie beschrieben dehydriert und anschließend mit ECi „gecleart“. Wie aus Abbildung 16 ersichtlich, war das Ethanol-ECi-basierte Verfahren bei allen drei Gewebetypen erfolgreich, wobei diese sich jedoch in ihrer jeweiligen Transparenz unterschieden.

Im Anschluss an die Etablierung individueller Inkubationszeiten zum optimalen Clearing der einzelnen Gewebetypen, wurde die Kombination dieses Verfahrens mit fluoreszent markierten Antikörpern zur Visualisierung von Blutgefäßen getestet, da die Färbung von Blutgefäßen für die weitere Arbeit von besonders großer Bedeutung war. Dabei erwiesen sich AlexaFluor-gekoppelte (AF) α CD31-Antikörper, die Endothelstrukturen anfärben, als besonders geeignet wobei die intra-venöse Applikation der Antikörper in lebende Tiere die besten Färberesultate lieferte. In allen getesteten Organen konnten mittels der Lichtblattmikroskopie erfolgreich gefärbte Endothelstrukturen visualisiert werden (Video 1).

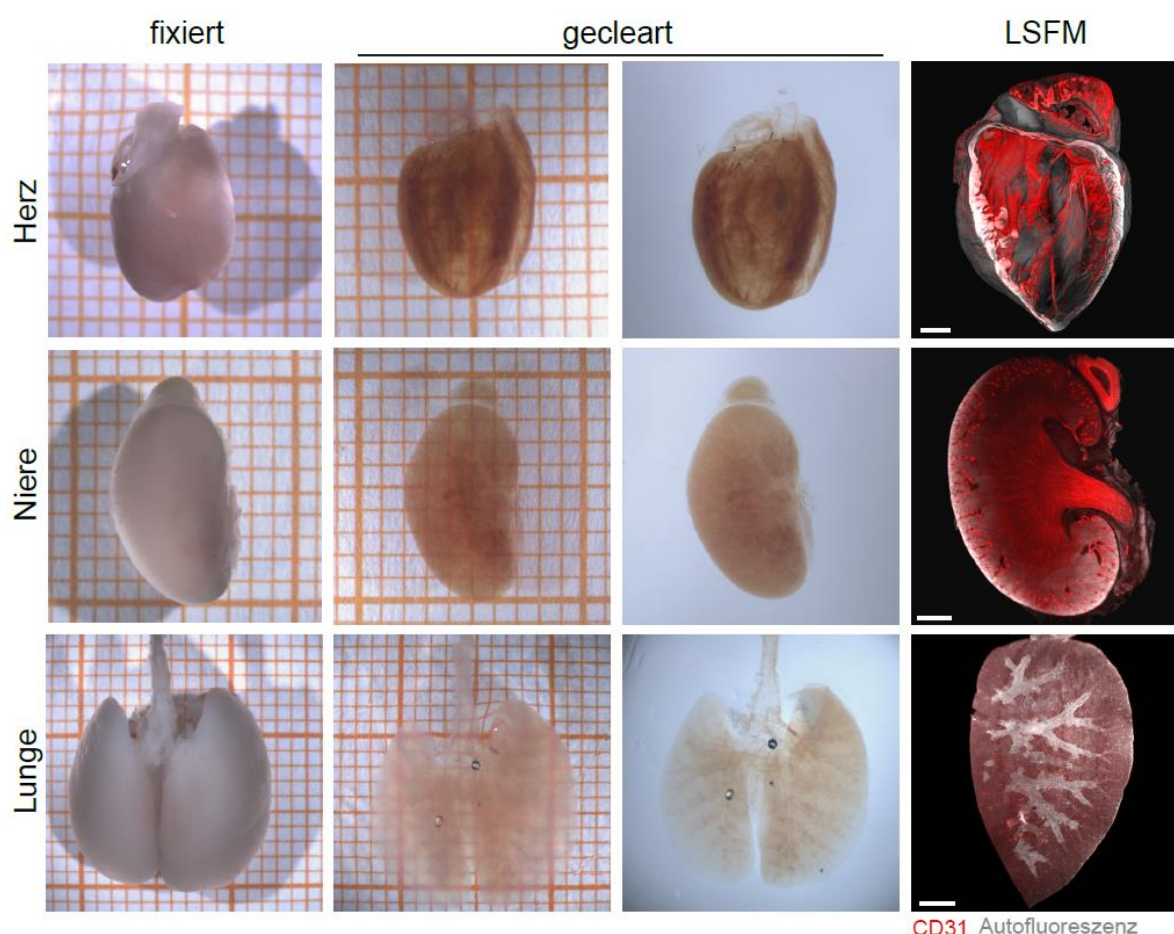


Abb. 16: ECi-Clearing und CD31-Färbung weicher Organe

Das optische Erscheinungsbild verschiedener weicher Organe verändert sich maßgeblich durch das Ethanol-ECi-Clearing. Während die PFA-fixierten Organe noch völlig undurchsichtig erscheinen, sind diese nach dem Clearing deutlich transparent geworden. Sowohl bei dem Herzen, der Niere als auch der Lunge ist das orangefarbene Gitter des Millimeterpapiers im Hintergrund deutlich durch die Organe hindurch zu erkennen. Mittels LSFM können das gesamte Herz, die gesamte Niere und einzelne Lungenflügel bis zu einer Größe von 2 cm visualisiert werden. Insbesondere bei der Niere können die stark vaskularisierten funktionellen Einheiten, die Glomeruli, deutlich gegenüber der Autofluoreszenz detektiert werden. (Herz $n = 10$, Niere $n = 26$, Lunge $n = 10$)

3.1.3 Charakterisierung des Ethanol-ECi-Verfahrens zur Optimierung der optischen Durchlässigkeit

Nach der erfolgreichen Etablierung eines Verfahrens zur Optimierung der optischen Durchlässigkeit weicher muriner Organe und der erfolgreichen Färbung von Endothelstrukturen mittels fluoreszent markierter Antikörper wurde das Verfahren weiter charakterisiert.

So wurde die Transparenz der Ethanol-ECi geclearten Organe mit anderen bereits publizierten Verfahren verglichen (Abbildung 17). Aus Sicherheitsgründen wurde bei dem 3Disco-Verfahren das zur Dehydrierung verwendete THF gegen Ethanol ausgetauscht. Ansonsten wurden die Protokolle wie beschrieben angewendet. Die spekt-

rophotometrischen Messungen zeigten keine erhöhte Absorption von ECI im Detektionsbereich des LSFMs gegenüber den anderen getesteten Clearing-Reagenzien. Die ECI-geclearte Niere wies zwar im sehr kurzwelligen Bereich von 400 bis 500 nm Wellenlänge eine erhöhte Absorption auf, die sich aber nicht negativ auf die LSFM auswirkte, da der im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendete Detektionsbereich erst bei 500 nm Wellenlänge begann. Ab dieser Wellenlänge wies die ECI-geclearte Niere eine hohe Transparenz auf, deren Absorption deutlich niedriger als beispielsweise die des angepassten 3Disco-Verfahrens war. Hinsichtlich der Transparenz von Knochen zeigte sich das Ethanol-ECi-Verfahren gleichwertig zu den anderen getesteten Verfahren.

Neben der zu erzielenden Transparenz der Organe sollten bei dem neu entwickelten Verfahren zur Optimierung der optischen Durchlässigkeit muriner Organe auch endogene Fluoreszenzproteine langfristig erhalten bleiben, was bei vielen publizierten Verfahren bisher nicht möglich ist^{94,95,98,109}. Daher wurden transgene Mausmodelle, die verschiedene FPs endogen exprimierten, untersucht. Wie in Abbildung 18 gezeigt, blieben die getesteten FPs bei dem Ethanol-ECi-Verfahren erhalten und konnten in verschiedenen Organen mittels LSFM visualisiert werden. So konnten in der CX3CR1-EGFP Maus grün fluoreszierende (engl.: green fluorescent protein, GFP) Zellen im Gehirn, bei der CD11c-EYFP Maus gelb fluoreszierende (engl.: yellow fluorescent protein, YFP) Zellen und bei der Catchup^{IVM-red} Maus tdTo-

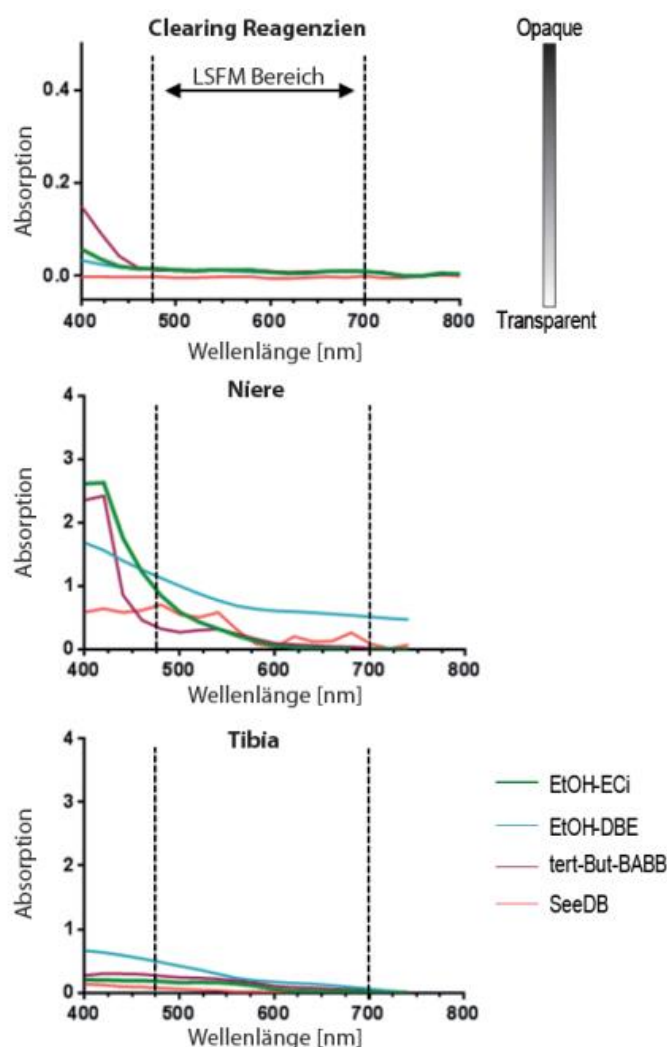


Abb. 17: Spektrophotometrische Untersuchung der Transparenz verschiedener Organe

Die Absorption von reinem ECI ist gleichwertig zu den Absorptionen anderer Clearing-Reagenzien wie BABB, DBE und SeeDB. Mittels verschiedener Verfahren geclearte Nieren weisen alle eine niedrige Absorption auf, wobei das Ethanol-ECi-Verfahren bessere Resultate als einige Vergleichsmethoden liefert. Auch das Clearing von Knochen resultierte in einer hohen Transparenz des Organs, wobei Ethanol-ECi gleichwertige Resultate zu den anderen Verfahren lieferte. (Anzahl der Messungen $n = 5$)

mato-positive neutrophile Granulozyten, die in die Lunge rekrutiert wurden, visualisiert werden¹¹⁰⁻¹¹².

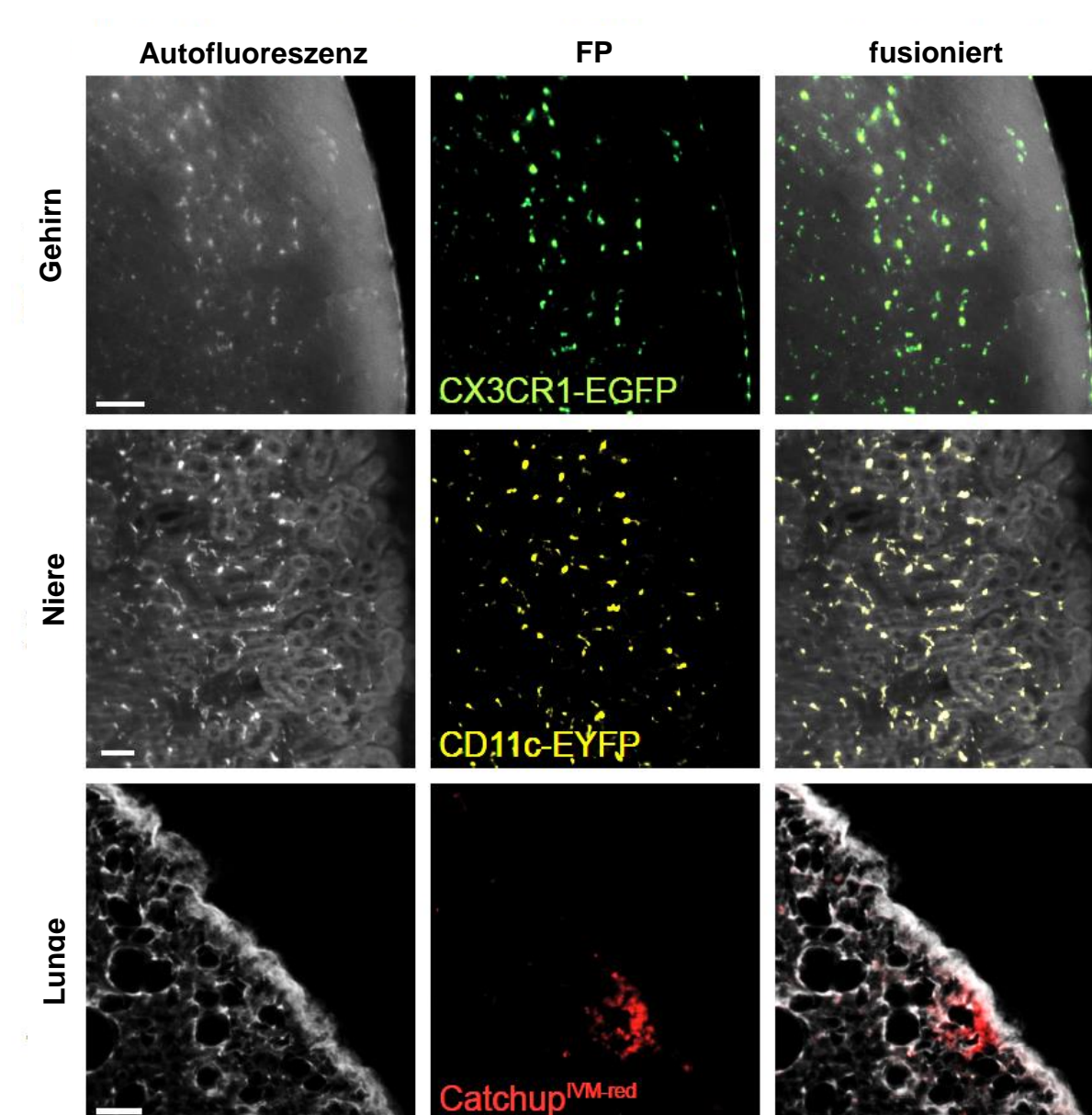


Abb. 18: Erhalt endogener Fluoreszenzproteine

Die Optimierung der optischen Durchlässigkeit mittels des Ethanol-ECi-Verfahrens ermöglicht den Erhalt diverser endogener Fluoreszenzproteine. Zur Überprüfung des GFP-Erhalts (grün) wurden Gehirne von CX3CR1-EGFP Mäusen und für den YFP-Erhalt (gelb) Nieren von CD11c-EYFP Mäusen gecleart. Zur Visualisierung von tdTomato-positiven neutrophilen Granulozyten (rot) wurden diese in die Lunge von Catchup^{IVM-red} Mäusen rekrutiert. (Alle Organe mindestens n=3)^{110,111,112}

3.1.4 Langzeitstabilität endogener Fluoreszenzproteine

Neben dem generellen Erhalt endogener FPs spielt auch die langfristige Stabilisierung der fluoreszenten Strukturen eine zentrale Rolle bei der Fluoreszenzmikroskopie. So ermöglicht der langfristige Fluoreszenzerhalt repetitive Messungen oder visuelle Analysen mit verschiedenen bildgebenden Verfahren. Da die bereits etablierten Lösungsmittel-basierten Clearingverfahren mittels DBE oder BABB endogene FPs

lediglich wenige Stunden bis Tage erhalten konnten, lag auch hier eine entsprechende Limitierung der Methoden vor^{94,95,98}.

Der Effekt von pH-Werten auf die Fluoreszenzaktivität von FPs wurde bereits vielfach beschrieben und ist auf die strukturellen Eigenschaften der Chromophore der FPs zurück zu führen^{102,113}. Diese können zwischen einem protonierten und einem deprotonierten, negativen Ladungszustand wechseln, wobei allerdings lediglich das negativ geladene Molekül fluoresziert. Folglich wurde getestet, ob die basische pH-

Bissung der Dehydrierungsreagenzien eine langfristige Stabilisierung von endogenen FPs ermöglicht. Da das Fluoreszenzprotein EYFP einen hohen pK_s von 6,9 aufweist und somit besonders zum nicht-fluoreszenten protonierten Ladungszustand tendiert, wurde eben dieses FP zur Langzeitüberprüfung der Fluoreszenzstabilität gewählt¹¹⁴. Es wurden verschiedene Clearing-Protokolle mit und ohne pH-Anpassung der Dehydrierungslösungen an CD11c-EYFP Nieren durchgeführt und repetitive Aufnahmen derselben Nieren über einen Zeitraum von über zwei Wochen mit dem Ultramikroskop angefertigt. Zur Analyse der Signalstärke wurden mittels ImageJ Areale definiert, die in ihrer Größe den YFP-positiven Zellkörpern entsprachen (engl.: region of interest, ROI). Pro Organ und Zeitpunkt wurden jeweils 100 ROIs, die YFP positive Zellkörper enthielten, und 100 ROIs mit denselben Abmessungen, die nur autofluoreszentes Gewebe enthielten, hinsichtlich ihrer mittleren Signalstärke analysiert. Aus den jeweiligen Mittelwerten der YFP-Signalstärke und der Autofluoreszenz-Signalstärke wurde ein Quotient ermittelt, der die Fluoreszenzintensität zu den jeweiligen Zeitpunkten widerspiegelt. Folglich entspricht ein Fluoreszenzsignal, das sich in seiner Intensität nicht vom autofluoreszenten Hintergrund unterscheiden lässt, dem Intensitätsquotienten 1, während sich stärkere Fluoreszenzsignale in höheren Intensitätsquotienten äußern (Abbildung 19).

Anhand der lichtblattmikroskopischen Untersuchungen von geclearten CD11c-EYFP Nieren konnte so gezeigt werden, dass der basische pH von 9,0 der Ethanol-Dehydrierung eine langfristige Stabilisierung des EYFPs von mehr als zwei Wochen ermöglichte. Durch diese Anpassung konnten neben dem Ethanol-ECi-Verfahren auch die EYFP-Signale anderer Verfahren, wie dem BABB-Clearing und dem 3Disco-Protokoll deutlich verlängert werden. Hingegen war bei dem EtOH-BABB Verfahren ohne pH-Anpassung bereits an Tag 1 nach dem Clearing nahezu keine Fluoreszenz mehr detektierbar. Neben dem langfristigen Erhalt des EYFP-Signals mittels der pH-Anpassung der Dehydrierungsreagenzien, bei denen das Ethanol-ECi

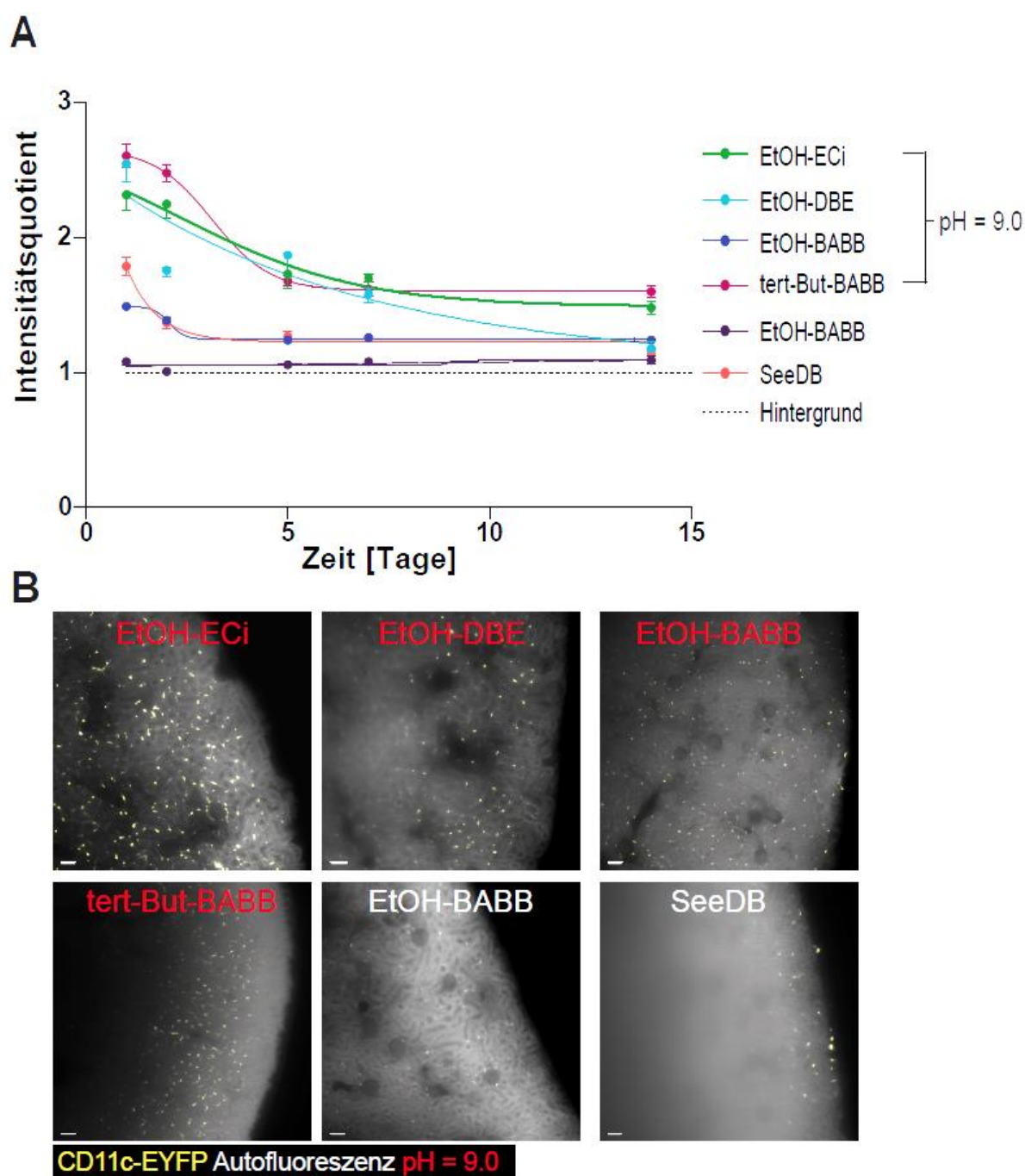


Abb. 19: Langzeiterhalt endogener Fluoreszenzproteine

(A) Die pH-Anpassung der Dehydrierungsreagenzien Ethanol und tert-Butanol resultiert in einem langfristigen Erhalt des endogen exprimierten YFP-Signals in CD11c-EYFP Nieren, die mit verschiedenen Clearing-Reagenzien behandelt wurden. Das neu entwickelte Ethanol-ECi-Verfahren zählt dabei hinsichtlich der langfristigen Signalstärke zu den beiden besten verfügbaren Methoden. Ohne pH-Anpassung der Dehydrierungsreagenzien ist kein langfristiger Erhalt des FPs möglich, wie an dem Ethanol-BABB Verfahren ohne pH-Anpassung gezeigt wurde. Hier ist bereits an Tag 1 nach dem Clearing kaum noch ein FP-Signal detektierbar (Anzahl der Messungen pro Probe pro Zeitpunkt $n=100$). (B) Beispielhafte Ausschnitte der verschieden geclearten CD11c-EYFP Nieren an Tag 1 nach dem Clearing. Es sind trotz konstanter Mikroskopeinstellungen unterschiedliche Morphologien hinsichtlich der Zellgrößen und unterschiedliche optische Eindringtiefen in das Gewebe zu erkennen (Größenbalken = 50 μm). Abbildung basierend auf ¹⁰⁷

Verfahren zu den beiden signalstärksten Verfahren gehörte, konnten jedoch auch optische Unterschiede in der Zellmorphologie beobachtet werden. So erschienen die EYFP-positiven Zellkörper bei dem Ethanol-DBE, dem Ethanol-BABB und dem tert-Butanol-BABB Verfahren deutlich kleiner als bei dem Ethanol-ECi-Verfahren. Hin-

sichtlich der Größe der Zellkörper entsprachen die Signale der Ethanol-ECi-geclearten Nieren den mittels SeeDB, einem wasserbasierten Verfahren, geclearten Nieren. Allerdings war bei dem wasserbasierten SeeDB-Verfahren gegenüber den Lösungsmittel-basierten Verfahren eine deutlich reduzierte Eindringtiefe in das Gewebe zu beobachten.

Neben dem Erhalt der endogenen FPS wurden auch die Antikörperfärbungen überprüft. Die immunfluoreszenten Färbungen von Endothelstrukturen mittels CD31-AF647 sind bei dem Ethanol-ECi-Verfahren mindestens 10 Monate lang stabil (Daten nicht gezeigt).

3.1.5 Optische Eindringtiefen verschiedener Wellenlängen in Ethanol-ECi-geclearte Nieren

Durch die Optimierung der optischen Durchlässigkeit wird grundsätzlich die Eindringtiefe elektromagnetischer Strahlung in das Gewebe erhöht. Somit eignet sich dieses Verfahren nicht nur zur Anwendung in der LSM, sondern auch für andere fluoreszenz-basierte Mikroskopietechniken, wie die CLSM und die TPLSM, die durch Lichtstreuungseffekte in ihrer Eindringtiefe limitiert sind ¹¹⁵⁻¹¹⁸.

Um die optische Durchlässigkeit Ethanol-ECi-geclearter Organe zu überprüfen, wurden CD11c-EYFP Nieren, die zusätzlich zu dem kurzwelligen EYFP-Signal eine auf der CD31-AF647 Färbung basierende langwellige Fluoreszenz enthielten, mittels CLSM untersucht. Während unbehandelte Nieren selbst hinsichtlich des langwelligen AF647-Signals lediglich eine optische Eindringtiefe von etwa 50 µm ermöglichten, konnte ein drastischer Anstieg der Eindringtiefe in geclearten Organen nachgewiesen werden. So konnte das vergleichsweise kurzwellige EYFP-Signal bis zu einer Tiefe von etwa 800 µm im Nierengewebe detektiert werden. Das langwellige AF647-Signal hingegen war in seiner Detektion nur noch durch den Arbeitsabstand von 2500 µm des verwendeten Objektivs limitiert. Selbst bei dieser optischen Eindringtiefe konnten die Glomeruli der Nieren noch von dem umliegenden tubulären Gewebe unterschieden werden (Abbildung 20).

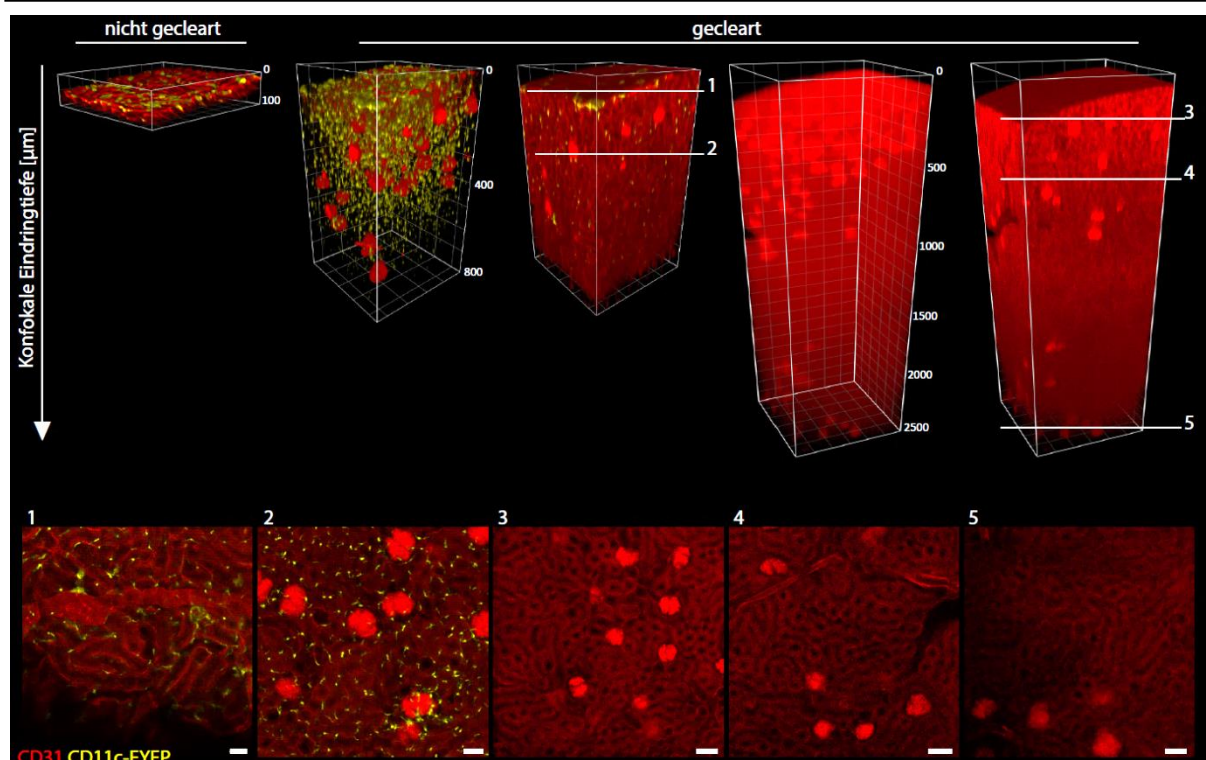


Abb. 20: Optische Eindringtiefen verschiedener Wellenlängen in Ethanol-ECi-geclearte Nieren

Zur Überprüfung der optischen Eindringtiefe wurde die konfokale Mikroskopie verwendet, da diese in opaken Organen selbst hinsichtlich langwelliger Strahlung stark in ihrer Eindringtiefe limitiert ist. So kann sogar das mit einem Exzitationsmaximum von etwa 650 nm und einem Emissionsmaximum von etwa 670 nm langwellige CD31-AF647-Signal (rot) in nicht geclearten Organen lediglich bis zu einer Tiefe von etwa 50 µm detektiert werden. In geclearten Organen erhöht sich die optische Eindringtiefe jedoch drastisch. So kann das vergleichsweise kurzwellige YFP-Signal (gelb, Ex. 514 nm, Em. 527 nm) in Ethanol-ECi-geclearten CD11c-EYFP Nieren bis zu einer Eindringtiefe von etwa 800 µm detektiert werden. Die optische Eindringtiefe bezüglich des CD31-AF647-Signals in ECi-Ethanol-geclearten Nieren war durch den Arbeitsabstand von 2500 µm des Objektivs limitiert. Selbst bei dieser großen optischen Eindringtiefe konnten noch spezifische Strukturen, wie die Glomeruli, identifiziert und von dem umliegenden tubulären Nierengewebe separiert werden (Größenbalken = 50 µm, Anzahl der Messungen n = 5). Abbildung basierend auf ¹⁰⁷

3.1.6 Anwendung des Ethanol-ECi-Verfahrens zur Analyse der NTN-vermittelten Glomerulonephritis in murinen Nieren

Als Anwendungsbeispiel für ein stark vaskularisiertes Organ wurden murine Nieren untersucht. Dabei sollten die Detektierbarkeit und Quantifizierungsmöglichkeit von Veränderungen in den Endothelstrukturen überprüft werden.

Daher wurden die stark vaskularisierten Glomeruli, deren Anzahl einen zentralen Parameter hinsichtlich der Nierenfunktionalität darstellt, in gesunden und erkrankten Nieren quantifiziert. Als Modell für eine Glomerulonephritis, die mit einer Gewebeschädigung der Glomeruli einhergeht und sich in der Schrumpfung dieser Strukturen äußert, wurde die nephrotoxische Nephritis (NTN) gewählt ^{2,119,120}. Mittels des etablierten Verfahrens zur Optimierung der optischen Durchlässigkeit über Ethanol und ECi und der Kombination mit der Endothelfärbung durch CD31-AF647 konnten die stark vaskularisierten Glomeruli in ganzen Nieren per LSFM mikroskopiert und analysiert werden. Es wurden neben gesunden Nieren auch NTN-erkrankte Nieren an Tag

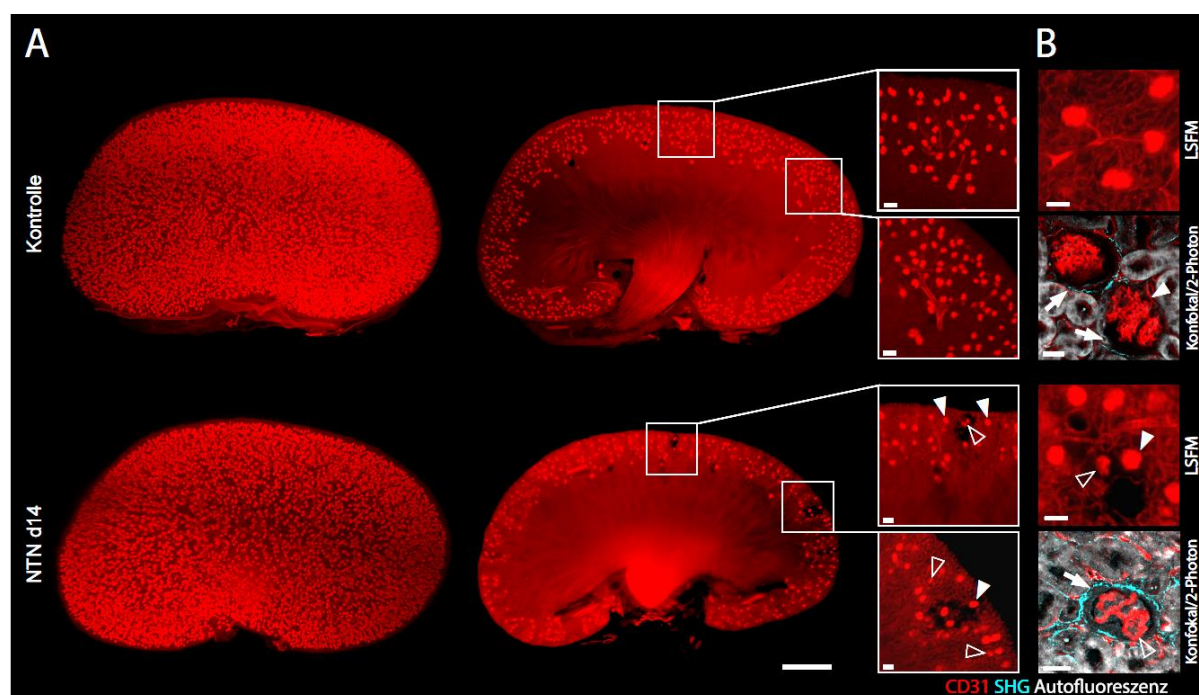


Abb. 21: Visualisierung der Endothelstrukturen in ganzen ECI-geclearten Nieren

(A) Die mittels Imaris erstellte 3D-Darstellung von ganzen ECI-geclearten Nieren zeigt die dichte homogene Verteilung der Glomeruli (rote Punkte) entlang der Nierenrinde. An Tag 14 der Glomerulonephritis (NTN T14) erscheinen die Glomeruli grundsätzlich weniger dicht in der Niere vorzuliegen. Durch optische Schnitte können einzelne geschädigte CD31-negative Areale lokalisiert werden (Größenbalken = 1000 μ m). Bei erhöhter Vergrößerung (weiße Boxen) ist deutlich zu erkennen, dass die geschädigten Areale neben normal großen (weiß gefüllte Pfeilspitzen) auch geschrumpfte Glomeruli (weiß geränderte Pfeilspitzen) enthalten (Größenbalken = 50 μ m). (B) Die erhöhte Auflösung der Glomeruli mittels LSFM und CLSM/TPLSM verdeutlicht die Schrumpfung (weiß geränderte Pfeilspitzen) der geschädigten Glomeruli gegenüber gesunden Glomeruli (weiß gefüllte Pfeilspitzen). Bei den NTN-geschädigten Nieren ist optisch eine Zunahme des SHG-Signals der Bowman-Kapsel (blau, weiße Pfeile) zu beobachten. Diese deutet auf eine Zunahme von Kollagenfasern hin (Größenbalken = 50 μ m). Abbildung basierend auf ¹⁰⁷

7 und Tag 14 nach Induktion der Glomerulonephritis untersucht. An Tag 14 konnten mittels LSFM geschädigte Areale in der gesamten Niere lokalisiert werden, die sich durch CD31-negative Gewebereiche und geschrumpfte glomeruläre Strukturen äußerten (Abbildung 22). Bei höherer Auflösung konnten sowohl mittels LSFM als auch CLSM und TPLSM die morphologischen Veränderungen der Glomeruli beobachtet werden. Neben der Schrumpfung der Glomeruli war ein erhöhtes SHG-Signal der NTN-geschädigten Bowman-Kapseln zu beobachten, was auf eine verstärkte Kollagenbildung hindeutet (Video 2).

Durch die Generierung eines Algorithmus zur voll automatisierten Analyse der LSFM-Daten mit dem Programm „Python“ konnten anschließend die Nierengröße, die Anzahl, die Durchmesser und die Volumina aller Glomeruli in CD31-AF647 gefärbten Nieren ermittelt werden (Video 3). Die benötigte Zeit zur automatisierten Datenauswertung betrug dabei pro Datensatz, also pro Niere, lediglich $2,8 \pm 0,7$ Stunden. Insgesamt wurden mittels dieser Methode über 300.000 Glomeruli aus 23 Nieren identifiziert und charakterisiert. In Bezug auf das Gesamtvolumen der Nieren konnte eine

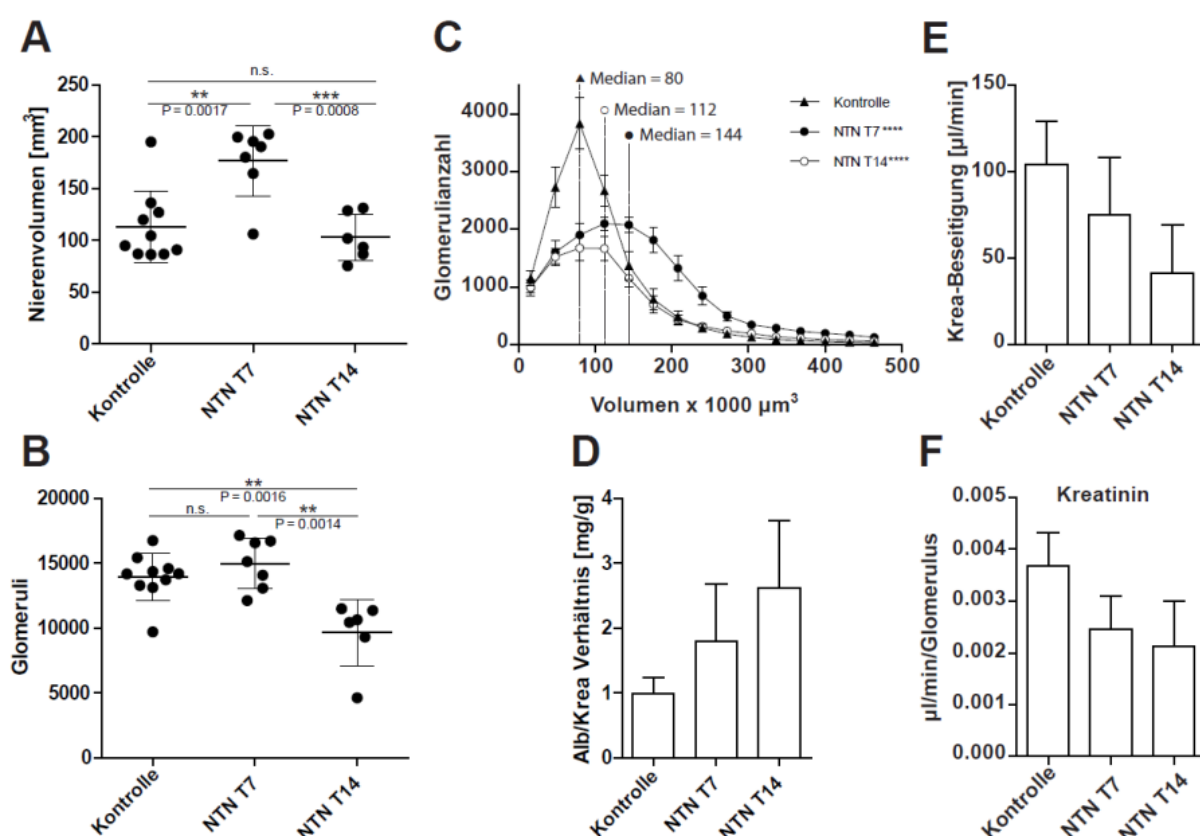


Abb. 22: Vollautomatisierte Analysen der Glomeruli in gesunden und erkrankten Nieren

(A) Die voll automatisierte Auswertung der LSM-Daten ganzer Nieren zeigt die charakteristische Volumenzunahme der NTN-erkrankten Nieren an Tag 7 (T7) und den Rückgang des Nierenvolumens an Tag 14 (T14) auf das Basallevel der gesunden Nieren (** $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, ungepaarter Kruskal-Wallis H-Test). (B) Die Totalzahlen der Glomeruli pro Niere wurden voll automatisiert anhand von LSM-Daten ganzer Nieren quantifiziert. Dabei trat eine hoch signifikante Abnahme der Glomeruli an T14 im Vergleich zu T7 und den Kontrolltieren auf (** $p < 0,05$, ungepaarter Kruskal-Wallis H-Test). (C) Die Verteilung der Glomeruli-Volumina an T7 und T14 im Vergleich zur Kontrollgruppe (**** $p < 0,001$, Chi-Quadrat-Test). Tägliche Urinalysen zeigten eine Abnahme der Filtrationsfähigkeit der NTN-geschädigten Nieren anhand der Zunahme des Albumin-Kreatinin (Alb/Krea) Verhältnisses (D) und der Abnahme der Kreatinin-Beseitigungsrate (Krea) mit zunehmendem Krankheitsverlauf (E). (F) Basierend auf der automatisierten Glomeruliquantifizierung wurde die Effektivität der Kreatinin-Beseitigung pro Glomerulum berechnet (nicht signifikant, ungepaarter Kruskal-Wallis H-Test). Für die Analysen (A) bis (C) wurden über 300.000 Glomeruli aus 23 Nieren verwendet und bei (D) bis (F) wurden $n=2$ Kontrolltiere, $n=3$ NTN T7 Tiere und $n=3$ NTN T14 Tiere analysiert. Abbildung basierend auf ¹⁰⁷

signifikante Zunahme der Volumina an Tag 7 der Glomerulonephritis gegenüber den Kontrolltieren und den NTN-erkrankten Tieren an Tag 14 beobachtet werden. Trotz der Volumenzunahme blieb die Anzahl der Glomeruli an Tag 7 im Vergleich zu den Kontrolltieren jedoch unverändert. An Tag 14 der Glomerulonephritis konnte dann eine signifikante Abnahme der Glomeruli in den erkrankten Nieren gegenüber Tag 7 und den Kontrolltieren beobachtet werden. Neben der Quantifizierung der Glomeruli wurden auch deren jeweilige Volumina ermittelt und analysiert. Dabei konnte korrelierend zu der Volumenzunahme der Nieren auch eine Volumenzunahme der Glomeruli an Tag 7 der Glomerulonephritis beobachtet werden. An Tag 14 entsprachen die Glomeruligrößen zwar denen der gesunden Nieren, allerdings lag hier eine wesentlich geringere Gesamtzahl vor.

Neben den LSM-basierten Daten wurden zusätzlich die Kreatinin- und Albuminwerte im Urin der Tiere überprüft. Während das Kreatinin in funktionierenden Glomeruli aus Kreatin gebildet und anschließend ausgeschieden wird, kann Albumin aufgrund seiner molekularen Größe die Basalmembran der Glomeruli nicht durchdringen und gelangt folglich nicht in den Urin. Im Falle der Schädigung der Glomeruli sinkt die Fähigkeit der Glomeruli Kreatinin zu bilden, während das Albumin durch die zerstörte Membran in den Urin freigesetzt werden kann^{120,121}. Entsprechend der optischen Beobachtungen der Nierenschädigungen durch die Glomerulonephritis konnte ein deutlicher Anstieg des Albumin-Kreatinin Verhältnisses gemessen werden. Darüber hinaus konnte eine starke Reduktion der Kreatinin-Beseitigung (engl.: creatinine clearance), die sich aus den Kreatinin-Werten des Urins, des Blutplasmas und dem Harnzeitvolumen ergibt, ermittelt werden. Basierend auf der ermittelten Gesamtzahl der Glomeruli wurde des Weiteren die Kreatinin-Beseitigung pro Glomerulum ermittelt. Auch dabei zeigte sich eine mit der Erkrankung fortschreitende Reduktion, die allerdings etwas schwächer verlief als die reine Kreatinin-Beseitigungsrate ohne Berücksichtigung der Glomerulianzahl (Abbildung 22).

3.1.7 Anwendung des Ethanol-ECi-Verfahrens bei harten Organen

Nachdem somit erfolgreich ein nicht-toxisches Verfahren zur Optimierung der optischen Durchlässigkeit von murinen Organen etabliert worden war, das sowohl immunfluoreszente Färbungen als auch endogene Fluoreszenzproteine über einen langen Zeitraum erhielt, sollte dieses Verfahren nun an Knochen getestet werden.

Da der kompakte Knochen aufgrund seiner Festigkeit eine erhöhte physikalische Barriere für die Dehydrierungs- und Clearing-Reagenzien darstellt wurden hier die Inkubationszeiten im Vergleich zu den weichen Organen um das Dreifache erhöht. Es zeigte sich, dass mittels des Ethanol-ECi-Verfahrens sowohl flache Knochen wie die Calvaria, als auch Röhrenknochen, wie die Tibia, Hand- und Fingerknochen, erfolgreich gecleart werden konnten (Abbildung 23, Video 4, 5). Das Knochenmark in großen Röhrenknochen wie der Tibia und dem Femur blieb bei diesem Verfahren rötlich gefärbt, was aber Hinsichtlich der Gesamttransparenz keinen negativen Einfluss hatte, siehe Abbildung 17 (Transparenzmessung).

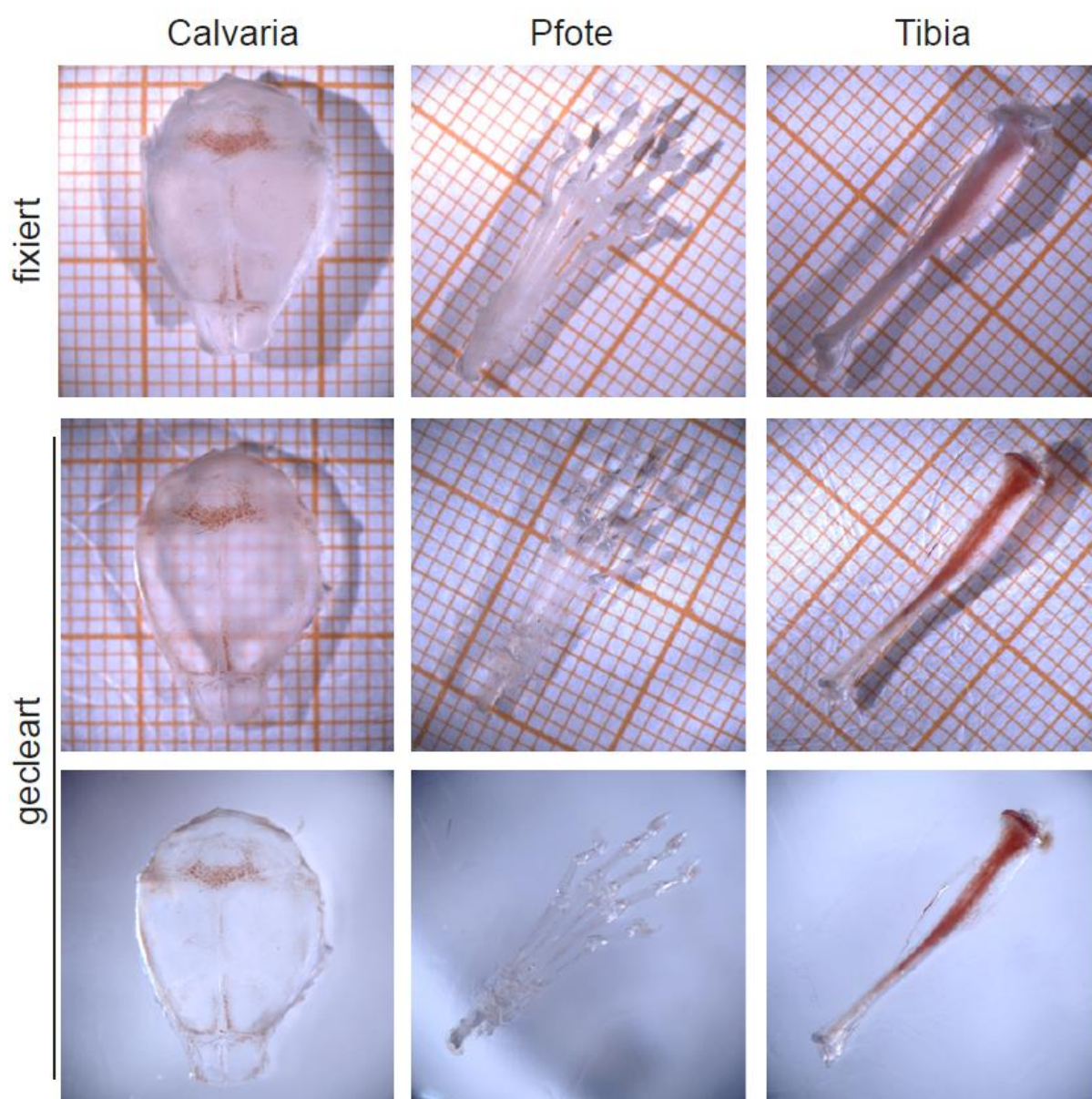


Abb. 23: ECI-Clearing verschiedener Knochentypen

Sowohl flache Knochen wie die Calvaria, als auch Röhrenknochen, wie die Finger- und Mittelhandknochen der Pfote oder die Tibia, lassen sich durch angepasste Inkubationszeiten des Ethanol-ECi-Verfahrens optisch clearen. Nach der Reduktion der Opazität durch das Clearing sind die orangenen Linien des Millimeterpapiers durch die Knochen hindurch zu erkennen. Das Knochenmark in der Calvaria und der Tibia erscheint nach dem Ethanol-ECi-Verfahren rötlich, was aber keinen negativen Einfluss auf die Organtransparenz hat (siehe Abbildung 17 – Transparenzmessung, alle Knochen n = 5).

3.1.8 Analyse der Gewebeschrumpfung durch das Ethanol-ECi-Verfahren

Insbesondere bei volumetrischen Untersuchungen, wie der Größenanalyse der Glomeruli, spielt der Erhalt der Gewebemorphologie eine zentrale Rolle. Da es bekannt ist, dass die Dehydrierung von Geweben mit Schrumpfungsartefakten assoziiert ist, wurde der Effekt des Ethanol-ECi-Verfahrens auf die Morphologie von harten und weichen Geweben überprüft^{95,98,100}. Dazu wurden als Beispiel für weiche Organe Nieren verwendet. Diese wurden über zwei verschiedene Routen behandelt, wobei der Effekt der PFA-Fixierung auf das Organvolumen und der Effekt des Clearingver-

fahrens selbst analysiert wurden. Die Volumenanalyse erfolgte über den Python-Algorithmus, der bereits zur Volumenanalyse der Nieren eingesetzt wurde. Das neu entwickelte Ethanol-ECi-Verfahren wurde dabei mit dem angepassten 3Disco- und dem tert-Butanol-BABB-Verfahren verglichen^{94,98}. Bei allen drei Methoden zeigten sich gleichwertige PFA-induzierte Volumenreduktionen und auch die Clearing-Methoden selber unterschieden sich hinsichtlich ihrer Schrumpfungartefakte nicht voneinander.

Zur Überprüfung der Gewebeschrumpfung von harten Organen wurde die Tibia verwendet, wobei die Blutgefäße innerhalb des Knochens hinsichtlich ihrer Durchmesser analysiert und verglichen wurden. Als unfixierte Proben dienten intra-vitale TPLSM-Aufnahmen. Diese wurden mit fixierten histologischen Schnitten, die mittels Weitfeldmikroskopie visualisiert wurden, und mit Ethanol-ECi-geclearten LSMF-Aufnahmen verglichen. Die Gefäßdurchmesser wurden mittels des Programms Imaris über das Bearbeitungswerkzeug „measurement points“ analysiert. Dabei zeigten sich weder für die im Knochenmark befindlichen Sinusoide, noch für kleine, im kompakten Knochen lokalisierte Blutgefäße signifikante Unterschiede (Abbildung 24).

Die Ergebnisse zur Entwicklung und Charakterisierung des Ethanol-ECi-Verfahrens wurden in einer gesonderten Arbeit publiziert und das Verfahren unter der Nummer 15197257.7 zum europäischen Patent angemeldet^{107,108}.

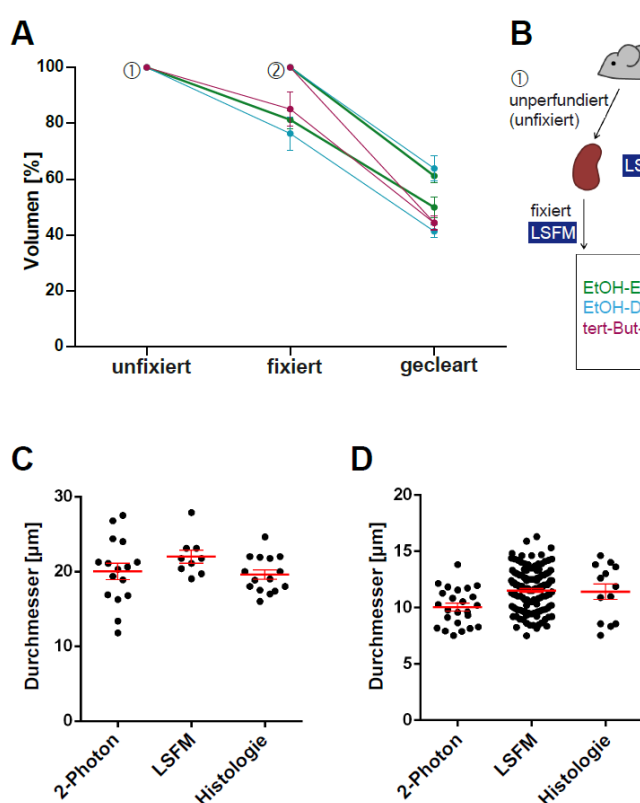


Abb. 24: Analyse von Schrumpfungsartefakten durch Gewebefixierungen und optisches Clearing

(A) Analyse der Gewebeschrumpfung durch PFA-Fixierung und der Optimierung der optischen Durchlässigkeit. Pro Methode wurden $n=3$ Tiere, also insgesamt 18 Nieren, analysiert. (B) Schematische Zeichnung der Probenpräparation und Mikroskopiezeitpunkte. Hinsichtlich des Ethanol-ECi-Clearings von harten Organen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bei den Gefäßdurchmessern von Sinusoiden (C) und Blutgefäßen im kompakten Knochen (D). Die Analysen erfolgten an Blutgefäßen, die mittels intra-vitaler TPLSM, auf fixierten Knochenschnitten mittels Weitfeldmikroskopie und in geclearten Knochen per LSMF mikroskopiert wurden. Jeder Punkt repräsentiert ein Blutgefäß, wobei je nach Methode Knochen von $n=5$ bis $n=12$ Tieren verwendet wurden. Abbildung basierend auf¹⁰⁷

3.2 Analyse des Blutgefäßsystems in murinen Röhrenknochen

Durch die Etablierung des Ethanol-ECi-Verfahrens zur Optimierung der optischen Durchlässigkeit war nun eine Methode verfügbar, die die 3D-Analyse des Blutgefäßsystems im murinen Röhrenknochen ermöglichen sollte.

3.2.1 Analyse von Blutgefäßstrukturen auf der Knochenoberfläche

Die Optimierung der optischen Durchlässigkeit mittels des Ethanol-ECi-Verfahrens ermöglichte nicht nur die mikroskopische Untersuchung der Knochen, sondern lieferte bereits makroskopisch erkennbare Informationen über die Gefäßstruktur in Röhrenknochen.



Abb. 25: Makroskopische Untersuchung von Röhrenknochen

(A) Auf der Oberfläche von Röhrenknochen, die von ihrem umliegenden Gewebe befreit wurden, zeichnen sich zahlreiche punktförmige blutgefüllte Strukturen ab. (B) Die optische Vergrößerung des Femurs mittels eines Stereomikroskops verdeutlicht die rötlichen Strukturen, die kanalartig in den kompakten Knochen eintreten. (C) Die Optimierung der optischen Durchlässigkeit mittels des etablierten Ethanol-ECi-Verfahrens lässt den kompakten Knochen transparent erscheinen, was die Visualisierung der blutgefüllten Kanäle im kompakten Knochen ermöglicht. (D) Die stereomikroskopische Vergrößerung des transparenten Knochens ermöglicht die Beobachtung eines verzweigten blutgefüllten Kanalsystems im kompakten Knochen der Tibia (weiße Pfeile). Dieses ist sowohl mit dem rötlichen Knochenmark als auch mit der Knochenoberfläche (weiß gestrichelte Linie) verbunden.

So konnten auf der freipräparierten Knochenoberfläche zahlreiche rötliche Punkte beobachtet werden, bei denen es sich mutmaßlich um Blutgefäßkanäle im kompakten Knochen handeln könnte. Bei Knochenproben, die nach der Ethanol-ECi-Behandlung transparent erscheinen, konnten diese Strukturen noch eindeutiger beobachtet werden. In den transparenten Proben konnten nicht nur oberflächliche Gefäßstrukturen beobachtet werden, sondern auch der Verlauf dieser blutgefüllten Kanäle durch den kompakten Knochen hindurch (Abbildung 25).

Die bedeutend größere optische Auflösung der Elektronenmikroskopie ermöglicht eine wesentlich detailliertere Darstellung der Knochenoberfläche. Dabei konnten die zahlreichen Poren auf der Oberfläche von Röhrenknochen erheblich deutlicher visualisiert und strukturelle Unterschiede der Poren ausgemacht werden. So konnten einerseits Poren beobachtet werden, die zahlreiche kleine Kanalöffnungen mit weniger als 1 μm Durchmesser aufwiesen. Daneben lagen aber auch größere Poren vor, die einen Durchmesser von etwa 10 μm aufwiesen und sowohl weiches Gewebe als auch Erythrozyten enthielten (Abbildung 26).

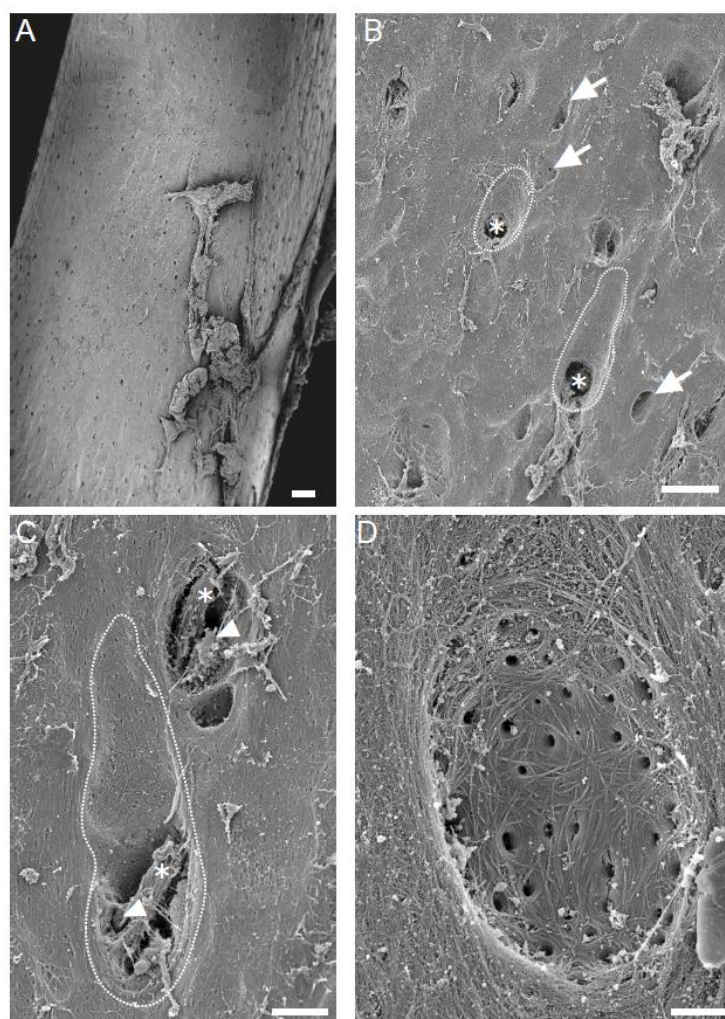


Abb. 26: ELMI-Aufnahmen der Knochenoberfläche

(A) Mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen lassen sich zahlreiche Poren auf der Knochenoberfläche beobachten (Größenbalken = 100 μm). (B) Bei höherer Auflösung lassen sich unterschiedliche Porentypen auf der Knochenoberfläche identifizieren. Zum einen liegen Poren vor, die zahlreiche kleine Kanalöffnungen mit einem Durchmesser unter 1 μm aufweisen (weiße Pfeile). Zum anderen liegen Poren vor, die einen Durchmesser von etwa 10 μm aufweisen (weiße Sterne) und mit Furchen auf der Knochenoberfläche (weiße gestrichelte Linien) assoziiert sind (Größenbalken = 20 μm). Werden diese Poren noch weiter optisch vergrößert, werden die morphologischen Unterschiede noch deutlicher. (C) Die etwa 10 μm großen Poren enthalten Erythrozyten (weiße Pfeilspitzen), weshalb davon auszugehen ist, dass es sich hier um Blutgefäße handelt. (D) Bei den kleinkanaligen Poren handelt es sich um die Canaliculi der Osteozyten.

Eine umfassende Literaturrecherche ergab, dass diese Art von Gefäßen bisher nicht beschrieben worden war, obwohl ihre Anzahl pro Röhrenknochen sehr hoch war. Aufgrund ihres Verlaufs durch die Kortikalis von Röhrenknochen wurde dieser neue Gefäßtyp daher als trans-Kortikalgefäß (TKG) bezeichnet.

3.2.2 Visualisierung mit der Tibia assoziierter Blutgefäße

Nach der Identifizierung verschiedener Poren auf der Knochenoberfläche, wobei es sich zum einen um die Canaliculi der Osteozyten und zum anderen mutmaßlich um Blutgefäße handelte, wurde die Kombination des Ethanol-ECi-Verfahrens und der Blutgefäßfärbung in Röhrenknochen eingesetzt, um die Strukturen näher zu charakterisieren.

Dazu wurden zum einen AF568-gekoppeltes Tomaten Lektin und zum anderen der AF647-gekoppelte Antikörper α CD31 getestet. Es zeigte sich, dass die im kompakten Knochen beobachteten Strukturen sowohl mit dem Tomaten Lektin-AF594 als auch mit α CD31-AF647 angefärbt werden konnten. Allerdings ergab sich bei der Anwendung von Tomaten Lektin eine gleichmäßige Färbung des gesamten Knochenmarks. Die α CD31-Färbung hingegen ermöglichte auch im Knochenmark eine spezifische Endothelfärbung, die die Visualisierung von einzelnen Blutgefäßen im Knochenmark ermöglichte. Somit konnten neben zahlreichen Blutgefäßen auf der Knochenoberfläche auch die vaskulären Strukturen innerhalb des Knochens untersucht werden (Abbildung 27, Video 6).

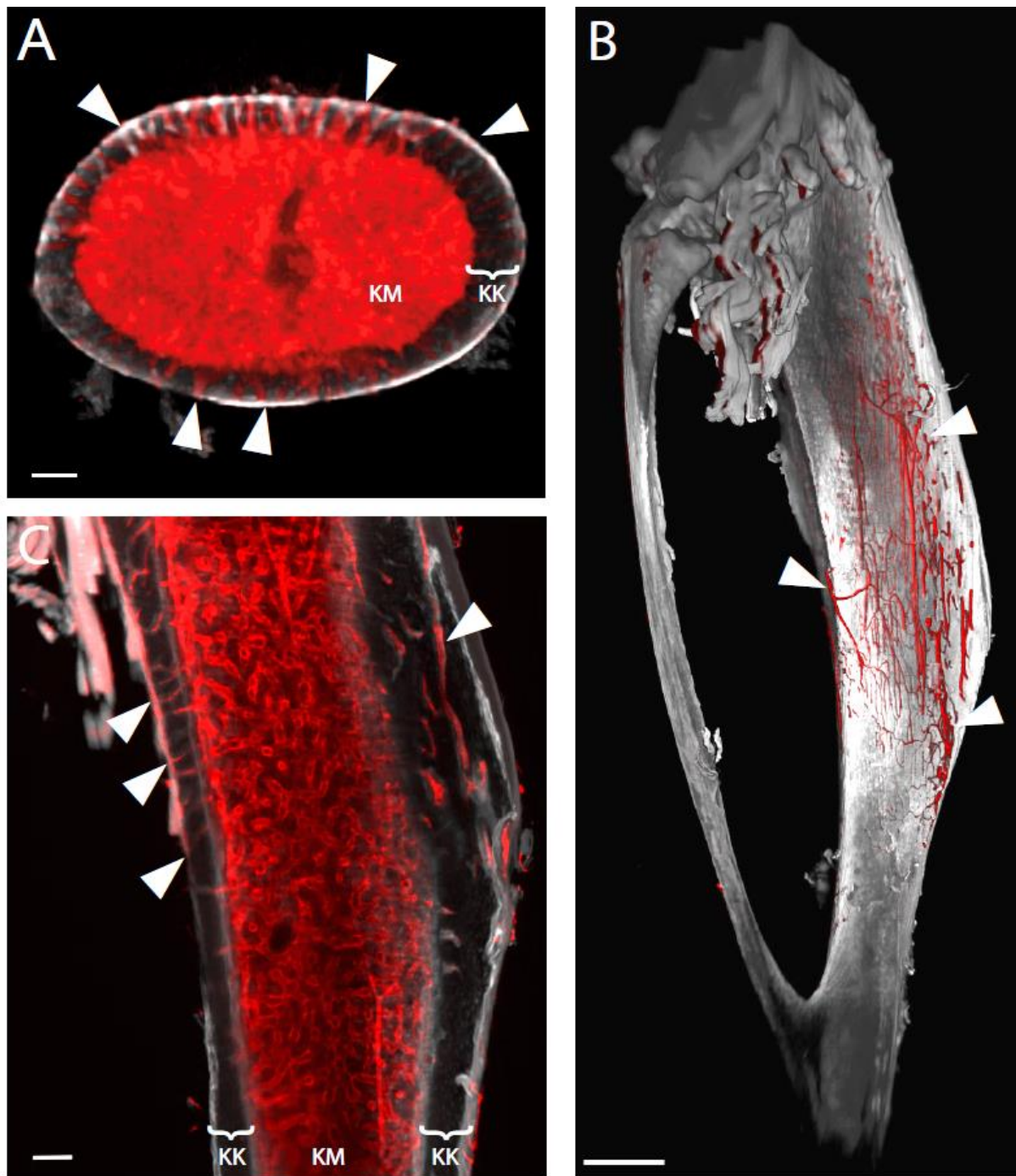


Abb. 27: Blutgefäßfärbungen in murinen Röhrenknochen

(A) Optischer Querschnitt durch eine OPT-Aufnahme eines C57BL/6J Femurs. Durch die Anwendung von Tomaten Lektin-AF594 (rot) sind zahlreiche Blutgefäße (weiße Pfeilspitzen), die den kompakten Knochen (KK) durchspannen und das Knochenmark (KM) mit der Knochenoberfläche verbinden (Autofluoreszenz, grau), zu erkennen. Allerdings erscheint das KM homogen rot gefärbt, was keine Analysen der Blutgefäßstruktur im KM zulässt (Größenbalken = 100 μm). (B) Die Endothelfärbung mittels $\alpha\text{CD31-AF647}$ (rot) ermöglicht die Visualisierung von Blutgefäßen auf der Knochenoberfläche (Autofluoreszenz, grau) mittels LSM. Bei der hier gezeigten Tibia sind zahlreiche Gefäße die in den Knochen eintreten oder aus ihm austreten zu erkennen (weiße Pfeilspitzen, Größenbalken = 1000 μm). (C) Ein optischer Schnitt durch eine Ethanol-ECi-geclearte Tibia zeigt zahlreiche Blutgefäße, die den KK durchziehen (weiße Pfeilspitzen), sowie ein komplexes Blutgefäßnetzwerk im KM (Größenbalken = 100 μm).

3.2.3 Identifizierung und Charakterisierung von Gefäßtypen in der Tibia

Um die Blutgefäße im Röhrenknochen typisieren zu können wurde die kombinierte Fluoreszenzfärbung des α CD31-Antikörpers zur allgemeinen Endothelfärbung mit der Arterien-spezifischen Antikörperfärbung mittels Sca-1 (Ly6A/E) etabliert. Somit lassen sich $CD31^+/Sca-1^+$ Arterien von $CD31^+/Sca-1^-$ Venen unterscheiden¹²².

Durch die Kombination dieser Antikörper mit dem Ethanol-ECi-Verfahren zur Optimierung der optischen Durchlässigkeit ließen sich nun die Blutgefäßstrukturen im gesamten Röhrenknochen visualisieren und identifizieren. Es wurden ausschließlich Tibiae von weiblichen 8-12 Wochen alten C57BL/6J Mäusen untersucht. Dabei konnte eine dominante Hauptarterie (engl.: nutrient artery, NA), die an der dorsalen Seite der Tibia kurz oberhalb des Fibula-Ansatzes lokalisiert ist, identifiziert werden. Diese drang auf der Knochenrückseite in den Knochen ein, durchlief den kompakten Knochen und verzweigte sich dann im Knochenmark. Diese arteriellen Verzweigungen verliefen longitudinal entlang der Knochenachse sowohl proximal als auch distal, wobei sie sich immer weiter verzweigten. Letztendlich endeten die arteriellen Verzweigungen am Endost oder an der Metaphyse, wo sie ein Gefäßnetzwerk ausbildeten. Darüber hinaus traten auch zahlreiche Hauptarterien an der Metaphyse in die Tibia ein, die ebenfalls parallel zum Knochenschaft verliefen und sich immer weiter bis zum Endost verzweigten.

Weiterhin verlief zentral im Knochenmark parallel zu den Arterien ein venöses Gefäß, welches den Zentralsinus darstellt und an der Vorderseite der Tibia unterhalb des Fibula-Ansatzes aus dem Knochen austrat. Des Weiteren trat dieses venöse Zentralgefäß distal an der Metaphyse aus dem Knochen aus. Neben den sich immer weiter verzweigenden Arterien lag ein venöses Gefäßnetzwerk im Knochenmark vor, das mit dem venösen Zentralgefäß verbunden ist. Anhand der Literatur ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um venöse Sinusoide handelt^{75,87,122}. Überraschender Weise konnten zahlreiche Blutgefäße im kompakten Knochen visualisiert werden, die über das Endost das Blutgefäßsystem des Knochenmarks direkt mit dem Periost zu verbinden scheinen. Dabei konnten erstmals sowohl arterielle als auch venöse Gefäße identifiziert werden.

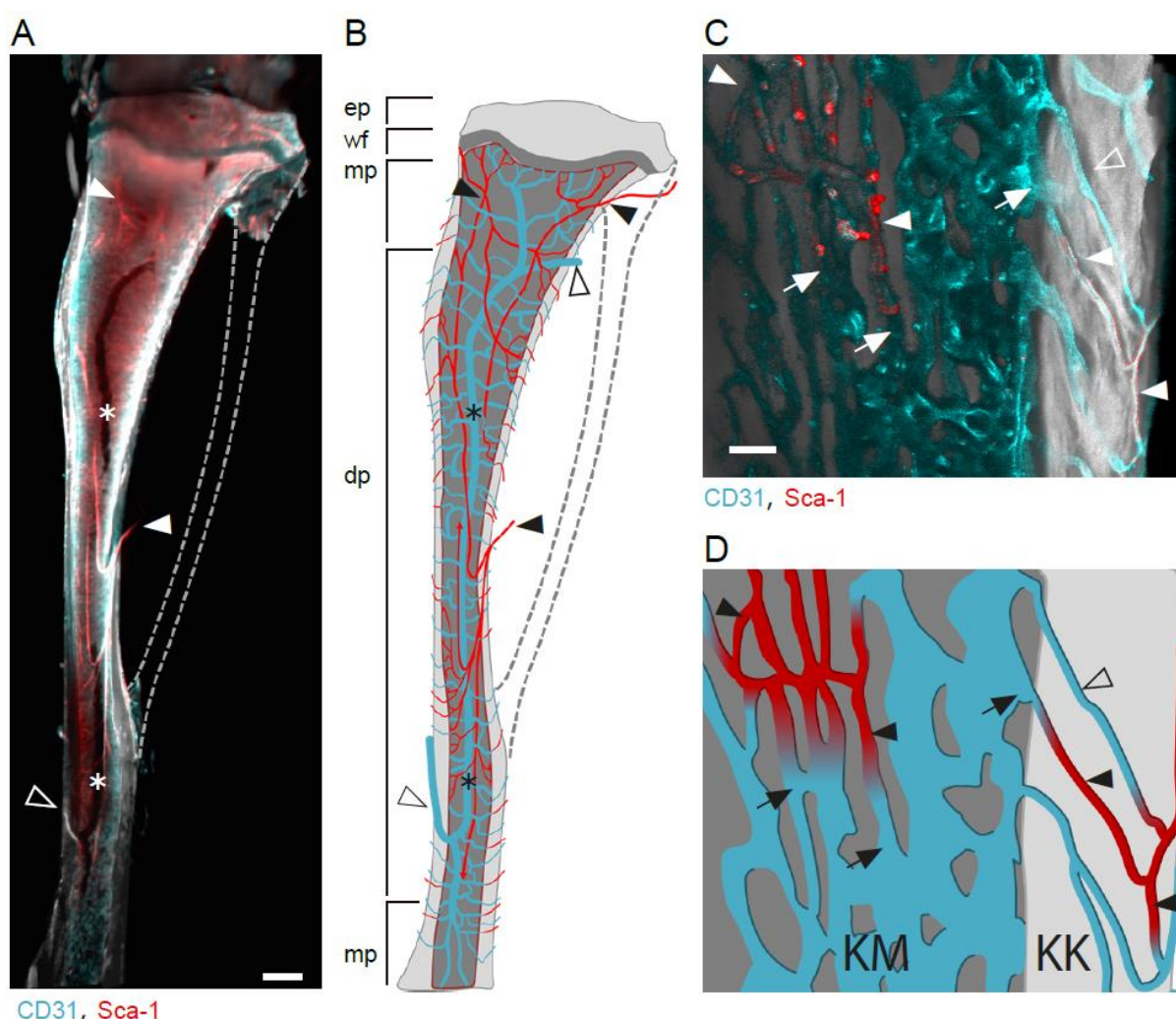


Abb. 28: Aufklärung des geschlossenen Blutkreislaufs im murinen Röhrenknochen

(A, B) LSFM-Aufnahme und schematische Zeichnung des Blutgefäßsystems einer mittels des Ethanol-ECi-Verfahrens geclearten Tibia. Eine dominante $CD31^{+}Sca1^{+}$ Hauptarterie (rot) tritt an der dorsalen Seite der Tibia oberhalb des Fibula-Ansatzes in den Knochen ein (weiße/schwarze Pfeilspitze) und verzweigt sich im Knochenmark in zahlreiche kleinere Arterien. Diese verlaufen parallel zum Knochenschaft sowohl proximal als auch distal. Dabei verzweigen sie sich immer mehr und nähern sich dabei immer weiter dem Endost und der Metaphyse an. Am Endost bilden die Arterien ein fein verzweigtes Netzwerk aus. Zusätzlich zu der einen dominanten Arterie an der Tibiarückseite treten zahlreiche Arterien an der Metaphyse (weiße/schwarze Pfeilspitzen) in den Knochen ein. Diese verlaufen ebenfalls parallel zum Knochenschaft und verzweigen sich immer weiter bis zum Endost. Zentral im Knochenmark verläuft ein $CD31^{+}Sca1^{-}$ venöses Gefäß (blau), das den Zentralsinus darstellt und unterhalb des Fibula-Ansatzes an der ventralen Tibiaseite sowie an der Metaphyse dorsal aus der Tibia austritt (weißer Stern, weiße/schwarze leere Pfeilspitzen). Das Knochenmark selber ist von einem venösen Gefäßnetzwerk durchzogen und der kompakte Knochen enthält zahlreiche arterielle und venöse Gefäße, die weiter als trans-Kortikalgefäße (TKGs) bezeichnet werden (Größenbalken = 1000 μ m). (C, D) Die hochauflösende Mikroskopie einer Ethanol-ECi-geclearten Fibula mittels kombinierter CLSM und TPLSM ermöglicht die detaillierte Darstellung der venösen und arteriellen Gefäßübergänge. Das $CD31^{+}Sca1^{+}$ arterielle Gefäßnetzwerk (rot), das sich am Endost ausbildet (weiße/schwarze Pfeilspitzen) verbindet sich dort direkt mit dem $CD31^{+}Sca1^{-}$ venösen Gefäßsystem des Knochenmarks (blau, weiße/schwarze Pfeile). Die TKGs können eindeutig als venös (weiße/schwarze leere Pfeilspitzen) oder arteriell (weiße/schwarze Pfeilspitzen) identifiziert werden. Sie durchdringen den gesamten kompakten Knochen (SHG, grau) und verbinden sich am Endost unabhängig von ihrem Gefäßtyp direkt mit dem venösen Gefäßsystem des Knochenmarks (weiße/schwarze Pfeile). An der Knochenoberfläche bilden sie ein komplexes venöses und arterielles Gefäßnetzwerk aus (Größenbalken = 50 μ m). (Tibiae LSFM n = 8, CLSM/TPLSM n = 3)

Um aufklären zu können, wo und wie die venösen und arteriellen Blutgefäße der Tibia miteinander verbunden sind, also wo und wie sich der Blutkreislauf des Röhrenknochens schließt, wurde zusätzlich zu der LSFM auch die kombinierte Visualisierung der Ethanol-ECi-geclearten Tibia-Knochen mittels CLSM und TPLSM genutzt.

Diese Methode liefert eine höhere Auflösung als die LSMF und ermöglicht somit die Blutgefäßstrukturen detaillierter mikroskopieren und analysieren zu können. Bei den entsprechenden Aufnahmen zeigten sich Verbindungen des arteriellen Netzwerkes am Endost mit dem venösen Blutgefäßnetzwerk. Die durch den kompakten Knochen verlaufenden Gefäße, die nun fortan als trans-Kortikalgefäße (TKGs) bezeichnet werden, können venös oder arteriell sein und verbinden sich unabhängig von ihrem Gefäßtyp ebenfalls am Endost mit dem venösen Gefäßsystem (Abbildung 28, Video 7, 8,9 10).

Basierend auf den LSMF-Daten wurden anschließend die identifizierten Gefäßtypen quantifiziert und analysiert. Dazu wurden mittels des Schnittwerkzeugs (engl.: slicer) von Imaris 100 µm dicke optische Schnitte in der x-y-Achse erstellt. Diese optischen Längsschnitte wurden durch den gesamten Knochen hindurch erstellt und als Einzelbilder gespeichert. Mittels des Zell-Zählungs-Programms (engl.: cell counter) von ImageJ wurden die anhand ihrer Antikörperfärbung identifizierbaren Blutgefäßtypen händisch ausgezählt. Zur Analyse der jeweiligen Gefäßdurchmesser wurde das Messpunkte-Programm (engl.: measurement points) von Imaris genutzt. Die Gefäßdurchmesser wurden damit händisch ermittelt.

Bei der Auswertung der so erhobenen Daten ergaben sich charakteristische Gefäßdurchmesser für die einzelnen identifizierten Gefäßtypen. Den geringsten Durchmesser mit durchschnittlich $4,86 \pm 0,04 \mu\text{m}$ wiesen die Arterien des endostalen Gefäßnetzwerkes auf. Mit durchschnittlich $11,5 \pm 0,1 \mu\text{m}$ Durchmesser waren die TKGs unabhängig davon, ob es sich um Arterien oder Venen handelte, deutlich größer als die endostalen Arterien, aber kleiner als die zentral im Knochenmark verlaufenden Arterien, mit einem Durchmesser von $20,6 \pm 0,2 \mu\text{m}$. Die Sinusoide des Knochen-

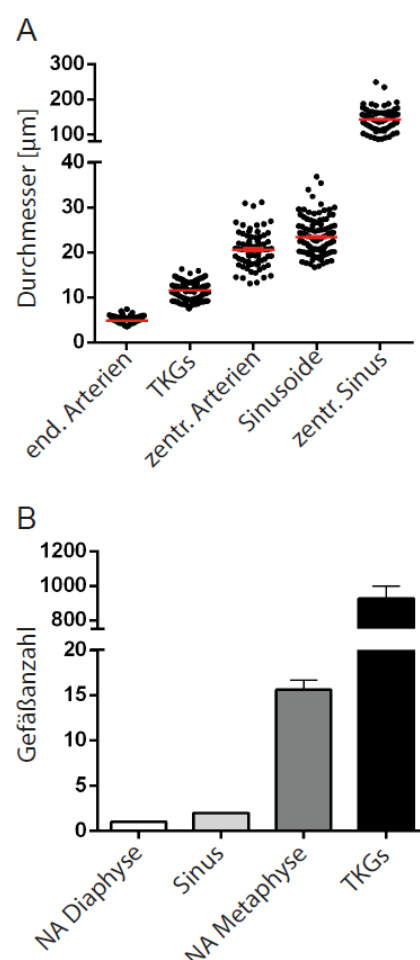


Abb. 29: Quantifizierung und Charakterisierung der Gefäßtypen in der C57BL/6J Tibia

(A) Für die verschiedenen in der C57BL/6J Tibia identifizierten Gefäßtypen ergaben sich charakteristische Gefäßdurchmesser. (B) Bei der Quantifizierung der identifizierten Gefäße konnten eine dominante Arterie (NA) an der Diaphyse und etwa 16 NAs an der Metaphyse nachgewiesen werden. Der zentrale Sinus verfügt über 2 Austrittsstellen aus der Tibia. Die TKGs machen mit rund 900 Gefäßen pro C57BL/6J Tibia den am häufigsten auftretenden Gefäßtyp, der das Knochenmark mit der generellen Blutzirkulation verbindet, aus. (Tibiae n = 8)

marks wiesen einen Durchmesser von $23,4 \pm 0,2 \mu\text{m}$ auf, wobei das mit Abstand größte Blutgefäß im Röhrenknochen der Zentralsinus mit einem Durchmesser von $142,7 \pm 1,8 \mu\text{m}$ darstellte (Abbildung 29).

Aufgrund der Komplexität und hochgradigen Verästelung des Gefäßnetzwerks im Knochenmark wurden ausschließlich die Blutgefäße quantifiziert, die das Gefäßsystem des Knochenmarks mit der generellen Blutzirkulation außerhalb des Knochens verbinden. Folglich wurden alle in den Knochen ein- oder austretenden Gefäße quantifiziert. Dabei wurden eine dominante Hauptarterie an der Rückseite der Diaphyse und $15,6 \pm 0,5$ Hauptarterien an der Metaphyse identifiziert. Der zentrale Sinus tritt an zwei Stellen aus der C57BL/6J Tibia aus. Die mit Abstand am häufigsten auftretenden Gefäße, die das Knochenmark mit der generellen Blutzirkulation verbinden, sind die TKGs mit durchschnittlich 926 ± 36 Gefäßen pro C57BL/6J Tibia. Insgesamt machen sie 98,1 % aller Gefäße im kompakten Knochen aus.

3.2.4 Charakterisierung der trans-Kortikalgefäße in der C57BL/6J Tibia

Aus den obigen Zahlen geht hervor, dass TKGs den am häufigsten vorkommenden Gefäßtyp ausmachen, der das Blutgefäßsystem des Knochenmarks mit der generellen Blutzirkulation verbindet. Allerdings sind diese Gefäße in der Literatur bisher kaum beschrieben worden. Daher fokussierten sich die weiteren Analysen auf die molekulare und funktionelle Charakterisierung dieser Blutgefäße.

Mittels der LSFM-Daten ganzer C57BL/6J Tibiae wurden die TKGs genauer typisiert. Dabei ließen sich verschiedene Verläufe der Blutgefäße durch den kompakten Knochen beobachten. Es wurden TKGs identifiziert, die geradlinig durch den kompakten Knochen verliefen und somit das Knochenmark direkt mit dem Periost verbanden. Dieser Gefäßtyp wird daher als direktes TKG (dTKG) bezeichnet. Die TKGs können sich im kompakten Knochen aber auch verzweigen, weshalb diese als gegabelte TKGs (gTKGs) angegeben werden. Neben der einfachen Gabelung können die Gefäße im kompakten Knochen auch vielfache Verästelungen aufweisen, weshalb diese im weiteren Verlauf als komplexe TKGs (kTKGs) bezeichnet werden. Neben diesen drei Formen der TKGs, die den kompakten Knochen vollständig durchzogen, waren zusätzlich Gefäße zu beobachten, die in der Kompakta Schleifen bildeten und somit ausgehend vom Knochenmark zu diesem zurück liefen. Diese Gefäße werden daher nicht als trans-Kortikalgefäße sondern als intra-kortikale Schleifen (IKS) bezeichnet (Abbildung 30).

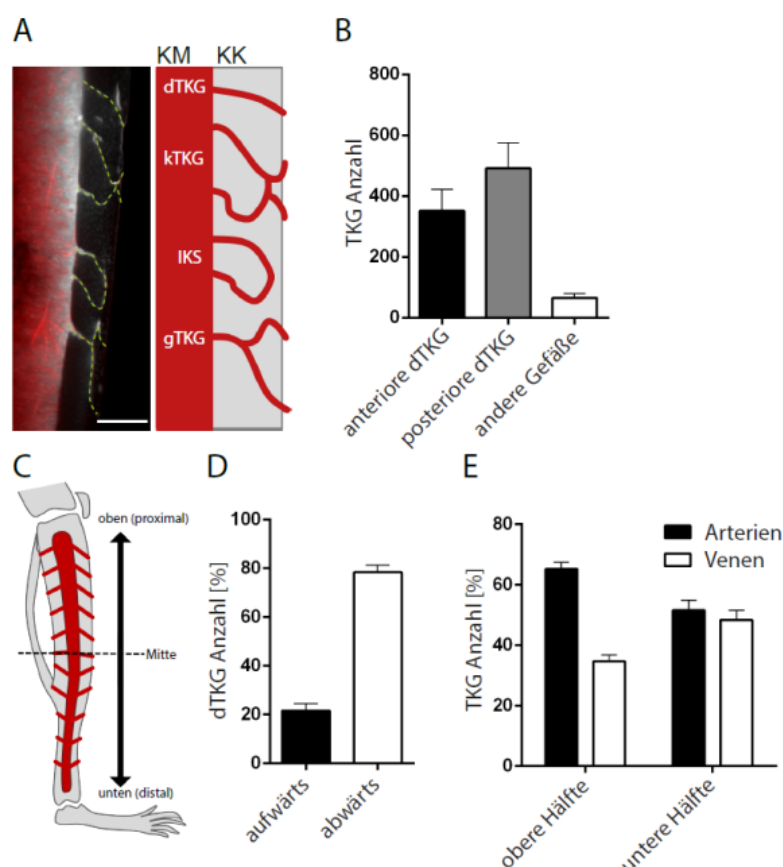


Abb. 30: Charakterisierung der TKGs

(A) LSFM-Aufnahmen von $CD31^+$ Blutgefäßen (rot) in einer C57BL/6J Tibia zeigen unterschiedliche Verläufe der Gefäße (grüne Linien) durch den kompakten Knochen (Autofluoreszenz, grau). Die schematische Zeichnung beschreibt die direkt (dTKGs), gegabelt (gTKGs) und komplex verästelt (kTKGs) durch den Knochen verlaufenden Gefäße. Daneben können die Blutgefäße auch Schlaufen innerhalb des kompakten Knochens (IKS) bilden (Größenbalken = 100 μ m). (B) Die Quantifizierung der TKG-Typen zeigt, dass die dTKGs den häufigsten Gefäßtyp ausmachen. (C) Schematische Darstellung der TKG-Orientierung (rot) sowie der Achsenorientierungen in der Tibia. (D) Von den dTKGs sind die meisten Gefäße distal, also zum Fußgelenk hin, orientiert und sind dabei in der oberen Tibiahälfte lokalisiert. Hingegen sind die in der unteren Tibiahälfte lokalisierten TKGs bevorzugt nach oben zum Knie hin (proximal) orientiert. Die jeweilige Gefäßorientierung ändert sich in der Mitte der Tibia oberhalb des Fibulaansatzes. (E) Verteilung der arteriellen und venösen TKGs in der C57BL/6J Tibia (Tibiae n = 8-10).

Diese insgesamt vier verschiedenen Formen von Blutgefäßen, die im kompakten Knochen von C57BL/6J Tibiae vorliegen, wurden nun weiter quantifiziert und charakterisiert. Dabei traten auf der Tibia inhomogene Verteilungen dieser Blutgefäße auf. Von den rund 900 TKGs in der gesamten Tibia entsprachen 92,7 % den dTKGs, während die verbleibenden 7,3 % die gTKGs, kTKGs und IKS umfassten. Von den dTKGs waren $351,3 \pm 35$, also 37,9 %, auf der anterioren und $491,3 \pm 42$ dTKGs, also 62,1 %, auf der posterioren Seite der Tibia lokalisiert. Die übrigen Blutgefäße der übrigen TKG-Typen waren homogen in der Tibia verteilt.

Neben der unterschiedlichen Verteilung der TKGs im kompakten Knochen konnten auch Unterschiede in der Gefäßorientierung innerhalb des kompakten Knochens beobachtet werden. Insbesondere die dTKGs änderten ihren Verlauf entlang des Knochenschaftes. So waren 21,6 % der dTKGs proximal und 78,4 % der dTKGs distal im kompakten Knochen orientiert. Interessanterweise befanden sich aber alle distal, also zum Fuß hin, orientierten Gefäße in der oberen Tibiahälfte, während die nach oben zum Knie hin orientierten TKGs in der unteren Tibiahälfte lokalisiert waren. In der Mitte des Knochenschaftes, oberhalb des Fibulaansatzes, änderten die dTKGs ihre Orientierung im Knochen. Die 78,4 % der distal orientierten dTKGs waren also

alle in der oberen Tibiahälfte lokalisiert, während die 21,6 % der proximal orientierten dTKGs in der unteren Tibiahälfte vorlagen.

Zusätzlich zu der Orientierung und Verteilung der TKGs in C57BL/6J Tibiae wurden der arterielle und venöse Gefäßanteil quantifiziert. Dabei zeigte sich, dass in der unteren Tibiahälfte mit 51,6 % zu 48,4 % die TKGs zu etwa gleichen Teilen arteriell oder venös sein konnten. In der oberen Tibiahälfte hingegen lagen mit 65,3 % zu 34,7 % deutlich mehr Arterien als Venen vor. Hinsichtlich des gesamten Röhrenknochens bestanden die TKGs also zu 58,5 % aus Arterien und zu 41,5 % aus Venen.

Neben der Verteilung und Orientierung der dTKGs konnten des Weiteren auch Unterschiede im Verlauf der dTKGs durch den kompakten Knochen beobachtet werden. Die dTKGs konnten demnach ganz gerade durch den kompakten Knochen verlaufen oder bis zu fünf verschiedene wechselnde Orientierungen im Knochen annehmen. Die Anzahl der Orientierungswechsel wurde für die entsprechende Analyse als Geradlinigkeits-Index definiert. Die Analyse der Gefäßverläufe erfolgte mittels Imaris. Dabei wurden die Orientierungswechsel der dTKGs händisch mittels des Messpunkte-Programms in 100 µm dicken optischen Schnitten von C67BL/6J LSFM-Daten, die mit dem Schnittwerkzeug generiert wurden, analysiert.

Bei der Quantifizierung der Gefäßverläufe durch den kompakten Knochen ergab sich, dass die dTKGs in 45,7 % der Fälle zwei Orientierungen, also einen Rich-

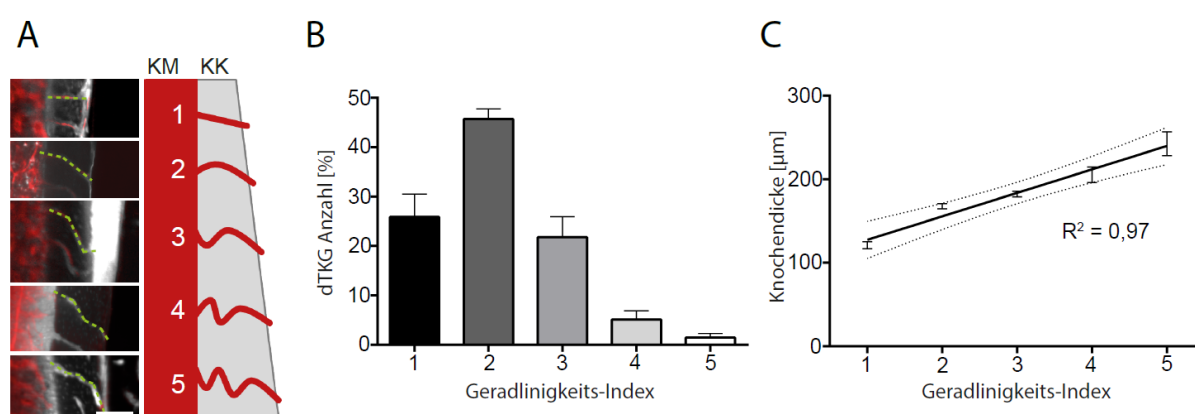


Abb. 31: Verlauf der TKGs durch den kompakten Knochen

A) Bei der Visualisierung der TKGs in C57BL/6J Tibiae mittels LSFM zeigte sich, dass die dTKGs (CD31, rot) bis zu fünf verschiedene Orientierungen im kompakten Knochen (Autofluoreszenz, grau) annehmen können (Größenbalcken = 100 µm). Anhand der schematischen Zeichnung sind die 5 verschiedenen Gefäßverläufe (rot), nummeriert nach der Anzahl ihrer Orientierungen vom Knochenmark (KM) durch den kompakten Knochen (KK) zur Knochenoberfläche hin, beschrieben. (B) Die Anzahl der Orientierungen der dTKGs im kompakten Knochen entspricht dem Geradlinigkeits-Index. Bei der entsprechenden Gefäßanalyse zeigte sich, dass am häufigsten dTKGs mit zwei Orientierungen im kompakten Knochen vorliegen. (C) Die Korrelationsanalyse der Verläufe der dTKGs und der Dicke des kompakten Knochens ergab mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,97$ einen klar linearen Zusammenhang dieser beiden Faktoren (Regressionsgerade = dicke schwarze Linie, 95 % Konfidenzintervall = gestrichelte Linie). (Gefäße n = 423 aus n = 6 Tibiae)

tungswechsel, im kompakten Knochen aufwiesen. Die übrigen Orientierungen der dTKGs, also die übrigen Stufen des Geradlinigkeits-Indexes, traten deutlich seltener auf. Auffällig war, dass gewisse Typen des Geradlinigkeit-Indexes verstärkt in definierten Arealen des kompakten Knochens, die sich durch ihre Knochendicke auszeichneten, auftraten. Daher wurden die dTKG-Verläufe durch den kompakten Knochen und die Knochendicke korreliert, wobei sich mit einem Bestimmtheitsmaß von $R^2 = 0,97$ ein linearer Zusammenhang zwischen der Knochendicke und den einzelnen Stufen des Geradlinigkeits-Indexes ergab. Dementsprechend stieg bei zunehmendem Durchmesser des kompakten Knochens die Anzahl der Orientierungswechsel der dTKGs linear an (Abbildung 31).

3.2.5 Nutzung der osseären Vaskularisation zur Zellmobilisierung

Nachdem durch die oben genannten Beobachtungen eines komplexen Gefäßnetzwerks im inneren des Knochenmarks mit wenigen großen zu- und abfließenden Gefäßen sowie einer sehr großen Zahl von TKGs erstmals ein kontinuierliches Blutgefäßsystem im Röhrenknochen dargestellt werden konnte, sollte nun die funktionelle Nutzung der TKGs hinsichtlich des allgemeinen Blutflusses sowie der Zellmobilisierung überprüft werden. Als Modell zur Zellrekrutierung wurde die Mobilisierung von neutrophilen Granulozyten mittels G-CSF genutzt, bei der bekanntermaßen große Zahlen von PMNs aus zentralen Speichern im Knochenmark innerhalb kurzer Zeit in die generelle Blutzirkulation mobilisiert werden ⁷⁴. Es wurden sowohl histologische Knochenschnitte angefertigt, als auch *in vivo* Untersuchungen via der intra-vitalen TPLSM durchgeführt.

Bei den histologischen Proben zeigte sich eine homogene Aktivierung der neutrophilen Granulozyten im gesamten Knochenmark, die sich in einer Akkumulation dieser Zellen an den Blutgefäßen im Knochenmark äußerte. Die intra-vitale TPLSM bestätigte diese Beobachtungen, wobei die technischen Limitierungen in der Eindringtiefe lediglich die Visualisierung des Endosts ermöglichten (Video 11). Zusätzlich zu den Gefäßen des Knochenmarks wurden aber auch die verschiedenen Gefäße, die den kompakten Knochen durchlaufen untersucht. Dabei konnte ein massiver Transport von GFP⁺ Zellen in der LysM-EGFP Maus durch den anterior gelegenen, aus dem Knochen austretenden Zentralsinus beobachtet werden (Video 12) ¹²³.

Darüber hinaus konnte mittels der intra-vitalen TPLSM erstmals auch in den TKGs ein massiver Blutfluss beobachtet werden. Dies war in bisherigen Studien, die auf μ CT-Daten basierten, vermutet worden, konnte mit diesen Methoden aber nicht gezeigt werden^{69,70}. Überraschenderweise wurden diese Gefäße ebenfalls zur Auswanderung aus dem Knochenmark in die generelle Blutzirkulation genutzt, wobei beobachtet werden konnte, dass neutrophile Granulozyten erst nach Applikation von G-CSF die TKGs zur Auswanderung nutzten. Besonders interessant war, dass die Blutflussrichtung durch die TKGs für die Zellmobilisierung unerheblich war. So konnten GFP⁺ Zellen beobachtet werden, die sowohl mit dem Blutstrom durch die TKGs aus dem Knochen austraten, als auch aktiv gegen Blutstrom der TKGs aus dem Knochen migrierten. (Abbildung 32, Video 13, 14).

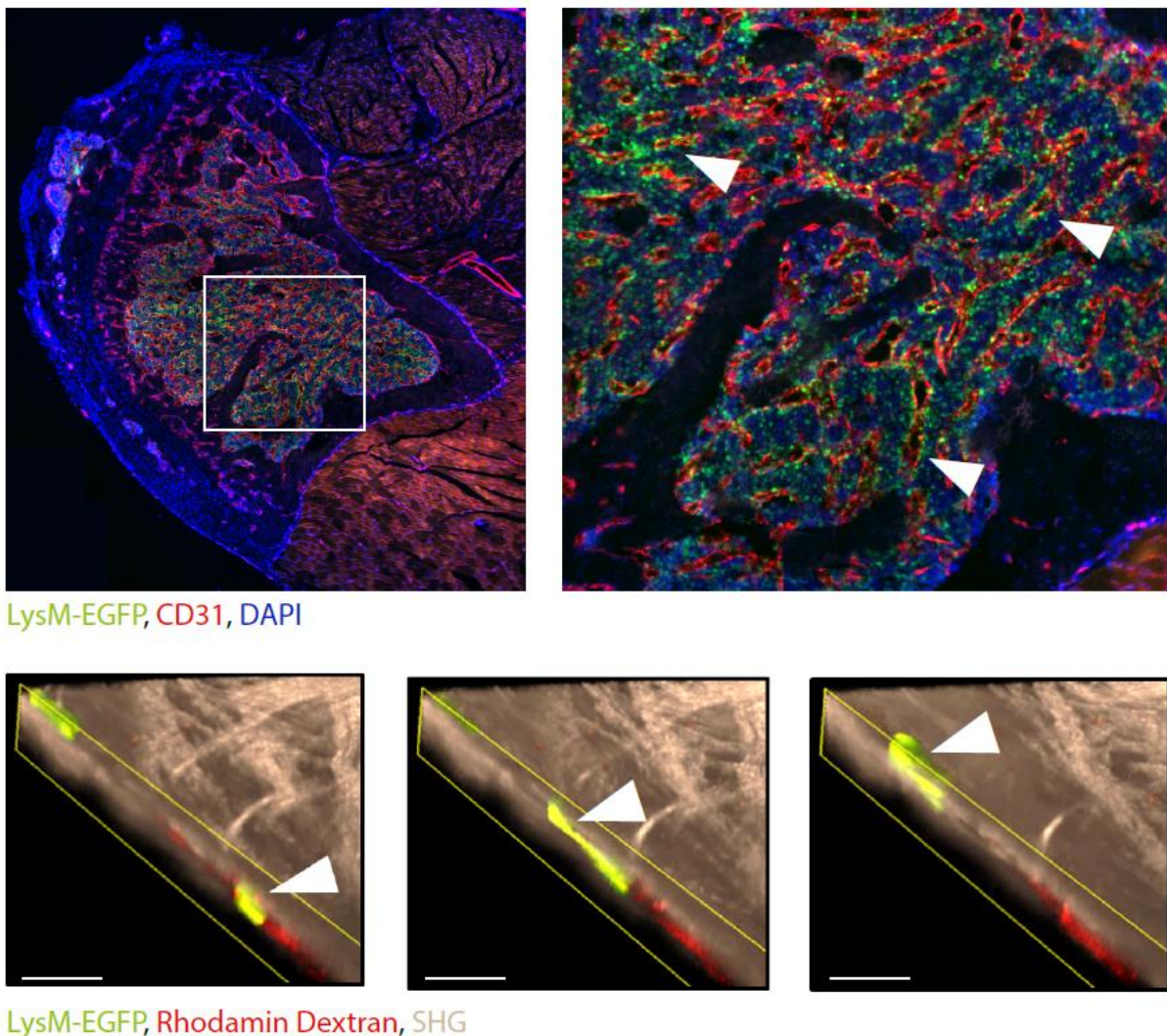


Abb. 32: Nutzung der osseären Blutgefäße zur G-CSF vermittelten Zellmobilisierung

(A) Histologischer Querschnitt einer LysM-EGFP Tibia mit umliegendem Muskelgewebe zwei Stunden nach G-CSF Applikation (Größenbalken = 100 μ m). (B) Vergrößerter Ausschnitt des Tibiaquerschnittes (weiße Box, Größenbalken = 50 μ m). Es sind zahlreiche Akkumulationen (weiße Pfeilspitzen) von GFP⁺ Zellen (grün) an den Blutgefäßen (CD31, rot) des Knochenmarks zu erkennen. (C) Die intra-vitale TPLSM ermöglicht die Visualisierung der Zellmobilisierung *in vivo*. Es konnten bei der LysM-EGFP Maus GFP⁺ Zellen, die durch TKGs (Rhodamin Dextran, rot) aus dem Knochenmark durch den kompakten Knochen (SHG, braun) an die Knochenoberfläche in die generelle Blutzirkulation migrieren, beobachtet werden (Größenbalken = 20 μ m). (Histologie n = 10, TPLS n = 7)

Basierend auf den intra-vitalen TPLSM-Aufnahmen sollten dann die Fließgeschwindigkeiten der verschiedenen Blutgefäßtypen, der Hauptarterien, der TKGs und des aus dem Knochen austretenden Zentralsinus, untersucht werden, um eine Abschätzung des Gesamtbeitrags der verschiedenen Gefäßtypen zum osseären Blutfluss zu ermöglichen. Die Visualisierung des Blutflusses erfolgte über frei zirkulierende Fluoreszenzfarbstoffe wie Rhodamin Dextran, Fitc Dextran oder Qtracker® 655 mit Hilfe von extrem schneller

TPLSM. Dabei erscheint das Blutplasma fluoreszent gefärbt, während sich die Erythrozyten als schwarze Schatten darstellen. Die Fließgeschwindigkeiten der Zellen waren allerdings nicht mittels des standardmäßig verwendeten nicht-resonanten Aufnahmemodus, der eine maximale Rastergeschwindigkeit von 1.800 Hertz (Hz) ermöglichte, visualisierbar. Daher wurde hier der resonante bidirektionale Aufnahmemodus mit 12.000 Hz Rastergeschwindigkeit verwendet, der einen ersten Eindruck von den Fließgeschwindigkeiten in den Blutgefäßen generieren konnte (Video 15).

Aus den Fließgeschwindigkeiten, die sich aus diesen Messungen ergaben, sollte der Volumenstrom der verschiedenen identifizierten Gefäßtypen in der murinen Tibia kalkuliert werden. Dazu wurde davon ausgegangen, dass die *in vivo* gemessenen Fließgeschwindigkeiten in allen Gefäßen eines Typs, also in allen TKGs und in allen Hauptarterien, gleich stark sind. Zusätzlich soll von einer laminaren Strömung ausgegangen werden, wobei auch Reibungsverluste vernachlässigt werden. Der Volumenstrom (Q) wird demnach wie folgt berechnet:

$$Q = v \cdot A$$

Dabei stellt v die mittlere Strömungsgeschwindigkeit [$\mu\text{m}/\text{sek}$] des Blutflusses und A die Querschnittsfläche [μm^2] des Gefäßes dar. Da bei den Blutgefäßen ein kreisrunder Querschnitt angenommen wird, ergibt sich A wie folgt:

$$A = \pi \cdot r^2$$

Anhand der bereits erhobenen Daten zu den Durchmessern und den Anzahlen der verschiedenen Gefäßtypen ließ sich der jeweilige Gesamtquerschnitt errechnen (Tabelle 2).

Tab. 2: Gesamtquerschnittsflächen definierter Gefäßtypen

	d [μm]	r [μm]	A [μm^2]	n	A_{gesamt} [μm^2]	A_{gesamt} [%]
TKG	11,50	5,75	103,87	926,00	96183,62	88,35
NA	20,60	10,30	333,29	16,60	5532,61	5,08
Sinus	67,47	33,74	3575,30	2	7150,60	6,57
Gesamt					108866,83	

Demnach wies ein TKG eine Querschnittsfläche von $103,87 \mu\text{m}^2$, eine NA eine jeweilige Querschnittsfläche von $333,29 \mu\text{m}^2$ und der austretende Hauptsinus eine Querschnittsfläche von $3575,30 \mu\text{m}^2$ auf. Diese charakteristischen Querschnittsflächen wurden mit der jeweiligen Gesamtzahl an quantifizierten Gefäßen multipliziert, so dass sich die jeweiligen Gesamtquerschnittsflächen A_{gesamt} für die verschiedenen Gefäßtypen in der C57BL/6J Tibia ergaben. Demnach wiesen die TKGS eine Gesamtquerschnittsfläche von $96183,62 \mu\text{m}^2$ auf. Im Vergleich zu den Hauptarterien mit $5532,61 \mu\text{m}^2$ und den beiden austretenden Sinusgefäßen mit insgesamt $7150,60 \mu\text{m}^2$ machten die TKGs 88,35 % der Gesamtquerschnittsfläche aller Blutgefäße, die das Knochenmark durch den kompakten Knochen mit der generellen Blutzirkulation verbinden, aus. Da 58,5 % der TKGs arteriell sind, machte die Gesamtquerschnittsfläche der TKGs rund 91 % der Gesamtfläche aller Arterien aus. Hinsichtlich aller

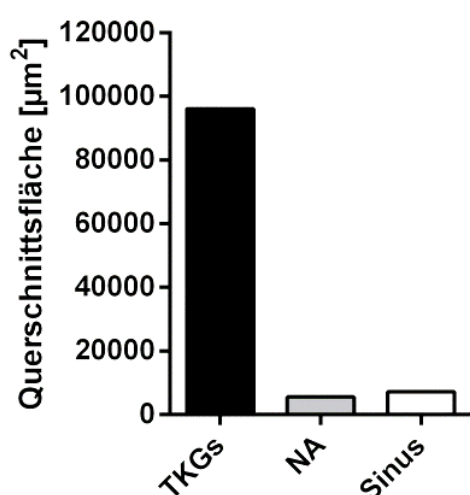


Abb. 33: Querschnittsflächen der verschiedenen Gefäßtypen der C57BL/6J Tibia

(A) Die TKGs weisen trotz ihres geringen Gefäßdurchmessers von $11,5 \mu\text{m}$ aufgrund ihrer hohen Anzahl die größte Gesamtquerschnittsfläche aller Gefäße im kompakten Knochen auf. Die vom Querschnitt her größeren Hauptarterien (engl.: nutrient artery, NA) und auch der austretende Sinus ergeben aufgrund ihrer geringeren Anzahlen in der Tibia vergleichsweise geringe Querschnittsflächen. (B) Da die TKGs in arterielle und venöse Gefäße unterteilt werden können, wurde der jeweilige Anteil an der arteriellen und venösen Gesamtquerschnittsfläche aller entsprechenden Gefäße in der Tibia kalkuliert. Demnach umfassen die arteriellen TKGs rund 91 % (schwarz) der Gesamtquerschnittsfläche aller Arterien in der C57BL/6J Tibia. Bezüglich der venösen Gefäße, machen die TKGs rund 85 % (schwarz) der Gesamtquerschnittsfläche aus. (Berechnungen basierend auf LSM Daten von $n = 8$ Tibiae)



venösen Gefäße, stellten die TKGs rund 85 % der Gesamtquerschnittsfläche dar (Abbildung 33). Dies belegt, dass die bisher in der Literatur weitgehend ignorierten TKGs einen enormen Anteil des Blutgefäßsystems des kompakten Röhrenknochens ausmachen.

3.3 Einfluss osseärer Erkrankungen auf die Vaskularisation muriner Röhrenknochen

3.3.1 Einfluss der Osteopetrose auf die Knochenvaskularisation

Als Modell zur Untersuchung der Osteoporose und ihren Einfluss auf die Knochenvaskularisation wurden weibliche 8-12 Wochen alte SWAP70^{-/-} Mäuse verwendet. Es wurden mittels der etablierten α CD31-Färbung und dem Ethanol-ECi-Verfahren Endothelfärbungen in geclearten Tibiae mittels LSM visualisiert. Die Gefäßzahlen der verschiedenen identifizierten Gefäßtypen, die den kompakten Knochen durchlaufen wurden quantifiziert. Dabei ergaben sich hinsichtlich der NAs und des aus der Tibia austretenden zentralen Sinus keine Veränderungen in den SWAP70^{-/-} Tibiae gegenüber den C57BL/6J Kontroll-Tibiae (Daten nicht gezeigt). Allerdings konnte eine hoch signifikante Zunahme der TKGs in den osteopetrotischen Tibiae beobachtet werden. Mit $941,0 \pm 40,5$ zu $1309,0 \pm 27,3$ Gefäßen wiesen die SWAP70^{-/-} Tibiae eine 1,4-mal so hohe Anzahl an TKGs als die Kontrolltiere auf. Auffällig war, dass die Anzahl der dTKGs gegenüber den C57BL/6J Tibiae in der SWAP70^{-/-} Maus auf 72,2 % sank und der Anteil der übrigen TKG-Typen, die gTKGs, kTKGs und IKS, auf 27,8 % anstieg, also ein tendenziell komplexeres Gefäßnetzwerk im kompakten Knochen der SWAP70^{-/-} Mäuse vorlag.

Um zu überprüfen, inwiefern diese strukturellen Veränderungen der Gefäßorganisation des kompakten Knochens der SWAP70^{-/-} Tibia einen Einfluss auf die Zellmobilisierung hatten, wurde die G-CSF vermittelte Mobilisierung von neutrophilen Granulozyten genutzt. Bei der durchflusszytometrischen Analyse der entnommenen Blutproben zeigte sich, dass die SWAP70^{-/-} Mäuse im unstimulierten Zustand nach PBS-Applikation, ein leicht erhöhtes Basallevel an neutrophilen Granulozyten, die im Blutkreislauf zirkulieren, in der Leukozytenpopulation aufwiesen. Das erhöhte Basallevel wich aber mit 20,80 % der Leukozytenpopulation nicht signifikant von dem Ba-

sallevel der PBS-behandelten C57BL/6J Kontrolltiere mit 12,87 % ab. Allerdings konnte hinsichtlich der G-CSF Mobilisierung von neutrophilen Granulozyten in die generelle Blutzirkulation bei den C57BL/6J Mäusen bereits zwei Stunden nach Appli-

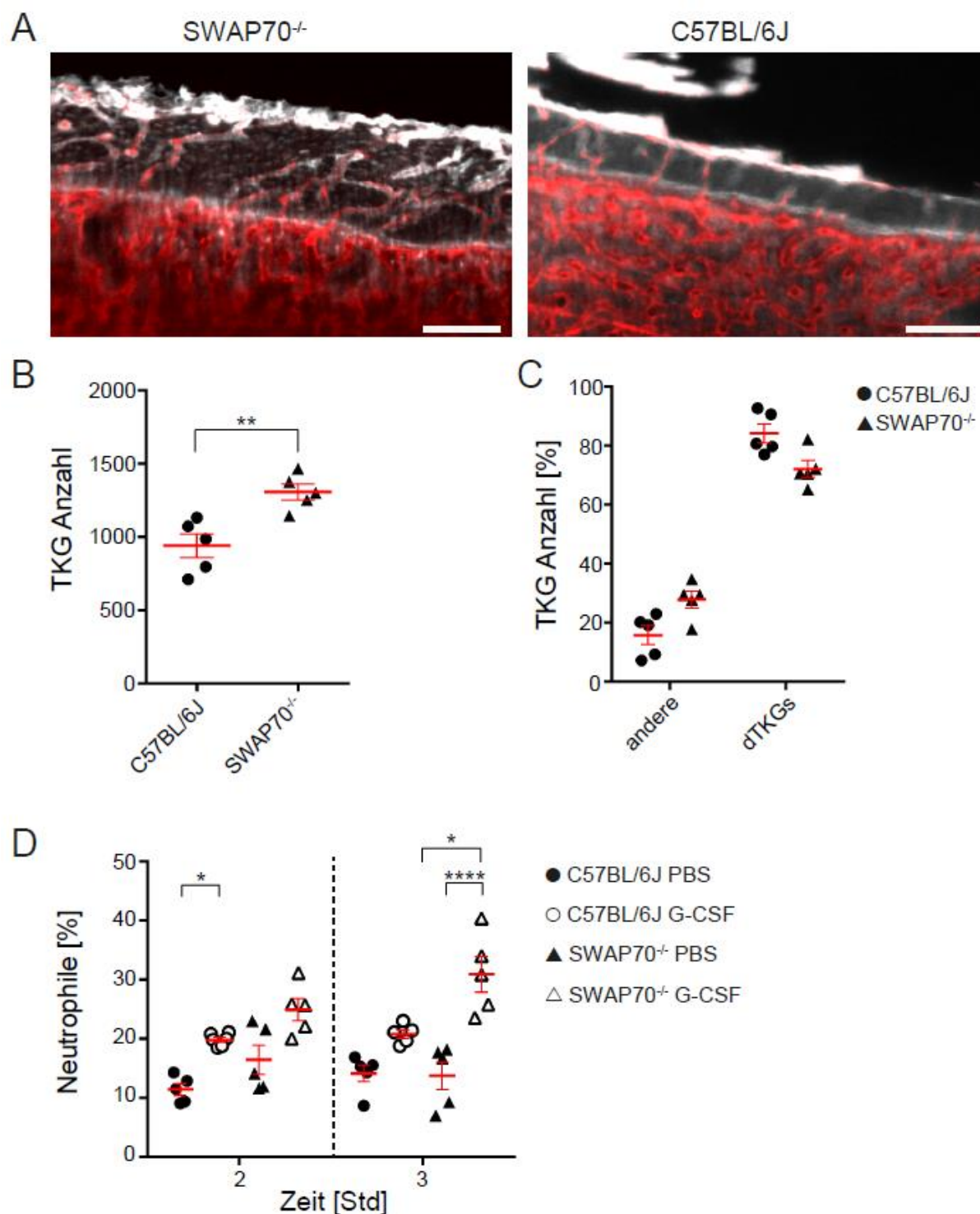


Abb. 34: Charakterisierung der SWAP70^{-/-} Knochenvascularisierung und Zellmobilisierung

(A) LSFM-Aufnahmen von C57BL/6J und SWAP70^{-/-} Tibiae. Im kompakten Knochen (Autofluoreszenz, grau) ist bei den SWAP70^{-/-} Tibiae eine deutliche Zunahme der TKGs (CD31, rot) gegenüber den C57BL/6J Tibiae zu beobachten. Auch erscheint das kortikale Gefäßsystem deutlich komplexer strukturiert (Größenbalken = 100 µm). (B) Die Quantifizierung der TKGs ergab eine hoch signifikante Zunahme der TKGs in den SWAP70^{-/-} Tibiae gegenüber den C57BL/6J Tibiae. (C) Der prozentuale Anteil der dTKGs sank bei der SWAP70^{-/-} Maus während die übrigen TKG-Typen anstiegen ((B) und (C) Mann-Whitney U-Test, **p < 0,005, jeweils n = 5 Tibiae). (D) G-CSF-vermittelte Mobilisierung von neutrophilen Granulozyten in die Blutzirkulation zwei und drei Stunden nach Stimulus-Applikation (Kruskal-Wallis H-Test, *p < 0,05, ****p < 0,001, n = 5 Tiere pro Gruppe, aufgeteilt auf n = 3 Versuchsdurchläufe).

kation mit ein mit 19,83 % deutlich höherer Zellanteil im Blut beobachtet werden, der einen signifikanten Unterschied zum Basallevel ausmachte. Obwohl bei den SWAP70^{-/-} Mäusen zwei Stunden nach G-CSF-Applikation mit 24,9 % neutrophile Granulozyten in der Leukozytenpopulation ein höherer Anteil als bei den C57BL/6J Kontrolltieren vorlag, unterschied sich dieser Anteil nicht signifikant vom leicht erhöhten Basallevel der osteopetrotischen Mäuse mit 16,44 %. Im Gegensatz dazu zeigte sich drei Stunden nach G-CSF Applikation ein hoch signifikanter Anstieg der neutrophilen Granulozyten in der Leukozytenpopulation der SWAP70^{-/-} Mäuse im Vergleich zu den PBS-behandelten Kontrolltieren. Mit 30,92 % der G-CSF stimulierten zu 13,78 % der PBS-behandelten Gruppe lag zu diesem Zeitpunkt ein hoch signifikanter Anstieg der neutrophilen Granulozytenpopulation vor. Und auch im Vergleich zu den G-CSF-behandelten C57BL/6J Mäusen, die 20,80 % neutrophile Granulozyten in der Leukozytenpopulation aufwiesen, lag ein signifikant höherer Anteil dieser Zellen im Blut vor (Abbildung 34).

3.3.2 Einfluss der Osteoporose auf die Knochenvaskularisation

Entsprechend der Analysen des SWAP70^{-/-} Osteopetrosemodells wurden die Effekte der Osteoporose anhand des TNFtg-Mausmodells auf die Knochenvaskularisation untersucht. Die Überexpression des humanen TNFs führt zu einer erhöhten Osteoklastenaktivität, die in diesem Mausmodell in der Entwicklung von Osteoporose und der Ausbildung einer rheumatoiden Arthritis resultiert^{7,124,125}. Um Einflüsse der rheumatoiden Arthritis zu vermeiden wurden hier ausschließlich 8 Wochen alte weibliche Tiere verwendet. Darüber hinaus weist das TNFtg-Mausmodell den genetischen C57BL/6N-Hintergrund auf, weshalb hier Wildtyp Geschwistertiere (engl.: Wildtype Littermates, WT Litt.) als Kontrolltiere verwendet wurden. Es erfolgte ebenfalls die Quantifizierung der Gefäßtypen in den Tibia-knochen anhand der beschriebenen LSM-Mikroskopie. Dabei zeigte sich, dass die WT Litt. mit $2112,0 \pm 79,5$ TKGs pro Tibia deutlich mehr Gefäße als die bisher untersuchten C57BL/6J Mäuse aufwiesen. Die an Osteoporose erkrankten TNFtg Mäuse wiesen mit $1628,0 \pm 50,1$ TKGs deutlich weniger Gefäße im kompakten Knochen auf, was einem hoch signifikanten Unterschied entsprach. In den osteoporotischen Tibiae der TNFtg Mäuse stieg der Anteil der dTKGs von 60,42 % auf 71,67 % an, während der prozentuale Anteil der übrigen TKG-Typen entsprechend von 39,58 % auf 28,33 % sank. Diese Unterschiede waren nicht signifikant, spiegeln aber dennoch die Abnahme der Komplexität des Gefäßnetzwerks im kompakten Knochen gegenüber den gesunden Kontrolltieren

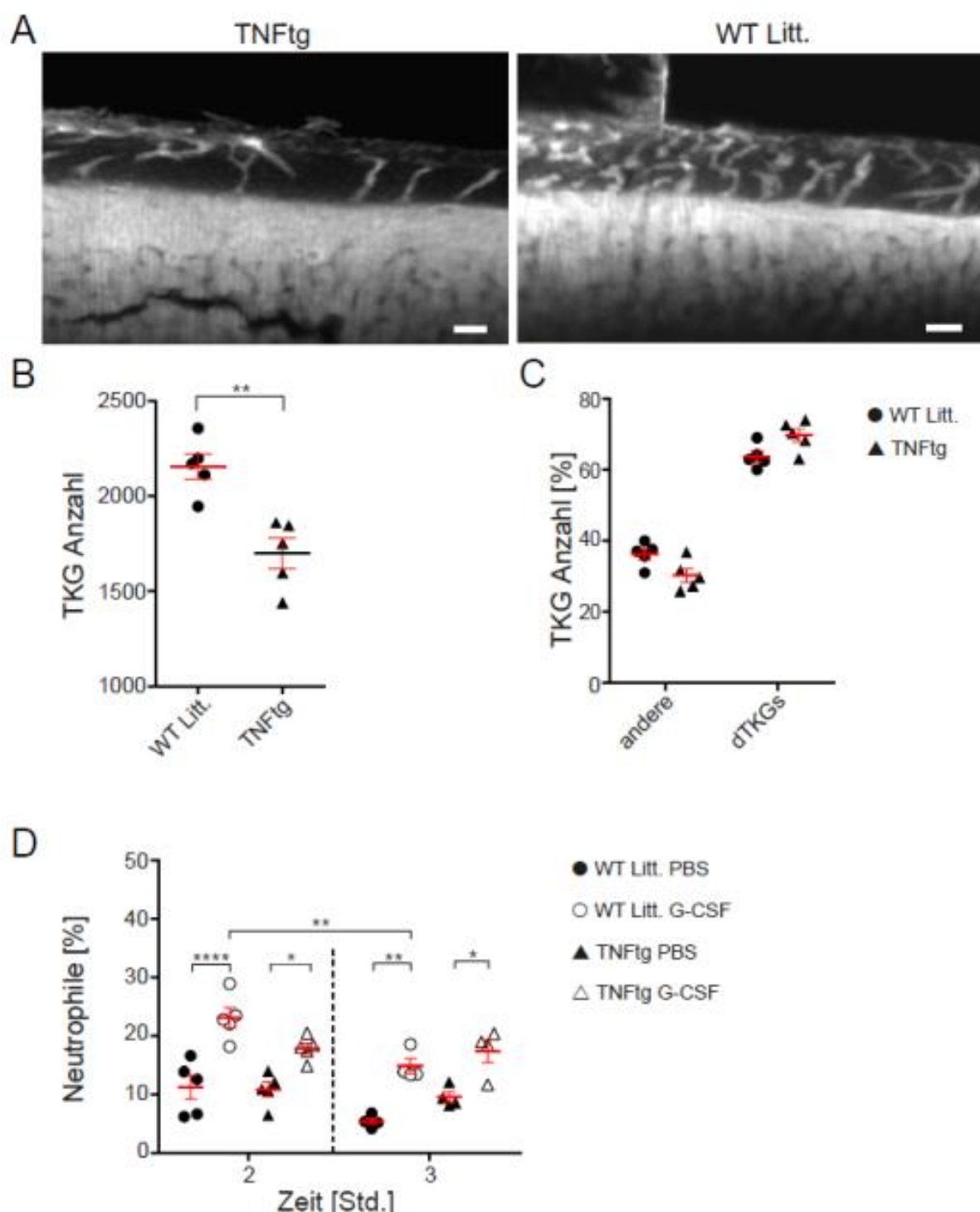


Abb. 35: Charakterisierung der TNFtg Knochenvascularisierung und Zellmobilisierung

(A) Die LSFM-Aufnahmen der TNFtg-Tibia zeigen ein deutlich weniger komplexes Gefäßnetzwerk im kompakten Knochen der Tibia (Autofluoreszenz, grau) im Vergleich zu den WT Littermate Tibiae (Größenbalken = 100µm). (B) Die Anzahl der TKGs in der TNFtg Tibia lag hoch signifikant niedriger als die TKG-Anzahl der WT Littermates. (C) Die WT Littermates zeigten ein deutlich komplexeres Gefäßnetzwerk als die osteoporotischen TNFtg auf. Diese Unterschiede zwischen den erkrankten und gesunden Tibiae waren jedoch nicht signifikant ((B) und (C) Mann-Whitney U-Test, $^{**}p < 0.005$, $n = 5-7$ Tibiae). (D) G-CSF-vermittelte Mobilisierung von neutrophilen Granulozyten in die Blutzirkulation zwei und drei Stunden nach Stimulus-Applikation (Kruskal-Wallis H-Test, $^{*}p < 0,05$, $^{**}p < 0,005$, $^{****}p < 0,001$, $n = 4-5$ Tiere pro Gruppe, aufgeteilt auf $n = 3$ Versuchsdurchläufe).

wider. Auch bei diesem Mausmodell wurden die Effekte der Gefäßveränderungen im kompakten Knochen auf die Zellmobilisierung anhand der G-CSF-vermittelten neutrophilen Granulozytenrekrutierung untersucht. Bei der Auswertung der durch-

flusszytometrischen Messungen zeigte sich eine hoch signifikante Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten zwei Stunden nach der G-CSF-Applikation bei den WT Tieren. Der prozentuale Anteil der neutrophilen Granulozyten in der Leukozytenpopulation stieg dabei von 11,2 % auf 23,1 % an. Bei den TNFtg-Mäusen wurde ebenfalls eine signifikante Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten detektiert, diese war aber mit 10,8 % zu 17,9 % deutlich geringer, als bei den gesunden WT Kontrolltieren. Drei Stunden nach der G-CSF-Applikation lag der Anteil an neutrophilen Granulozyten in der Leukozytenpopulation des Blutes bei den WT Mäusen mit 14,9 % zu 5,4 % der PBS-behandelten Kontrolltiere immer noch eine hoch signifikante Mobilisierung der neutrophilen Granulozyten in die Blutzirkulation vor. Allerdings entsprachen diese 14,9 % gegenüber den 23,1 % an neutrophilen Granulozyten, die zwei Stunden nach G-CSF-Applikation detektiert wurden, über die Zeit gesehen bereits einer hoch signifikanten Abnahme. Die TNFtg Mäuse wiesen auch drei Stunden nach G-CSF-Applikation mit 9,6 % zu 17,4 % eine den zwei-Stunden Werten entsprechende, leicht signifikante Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten in die Blutzirkulation auf. Dieser prozentuale Anteil, der sich auf die gesamte Leukozytenpopulation bezieht, unterschied sich jedoch nicht von den Werten, die zwei Stunden nach G-CSF-Applikation ermittelt wurden (Abbildung 35).

3.3.3 Einfluss der akuten und chronischen Arthritis auf die Knochenvaskularisation

Neben den Modellen zur chronischen Veränderung der Knochendicke durch genetische Modelle der Osteoporose und Osteopetrose wurden auch akute Effekte auf die Knochenvaskularisation durch die rheumatoide Arthritis untersucht. Dazu wurde eine chronische Arthritis mittels Glucose-6-Phosphat-Isomerase (G6PI) und Freund-Adjuvans (engl.: complete freund's adjuvant, CFA) in DBA/1 DREG Mäusen, deren regulatorische T-Zellen mittels Diphterietoxin depletiert wurden, induziert^{88,126,127}. Die Tibiae der entsprechend behandelten Tiere wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mittels LSM visualisiert und analysiert. Dabei wurden der Tag 14 nach Induktion der Arthritis, Tag 28 und Tag 62 untersucht. An Tag 14 liegt das Maximum der äußeren Anzeichen der akuten Entzündungsphase der Arthritis vor, während an Tag 28 die stärksten pathologischen Knochenabbau- und Knochenumbauprozesse gefunden wurden^{88,126}. Der Tag 62 wurde als Parameter für den Zustand der chronischen Arthritis untersucht.

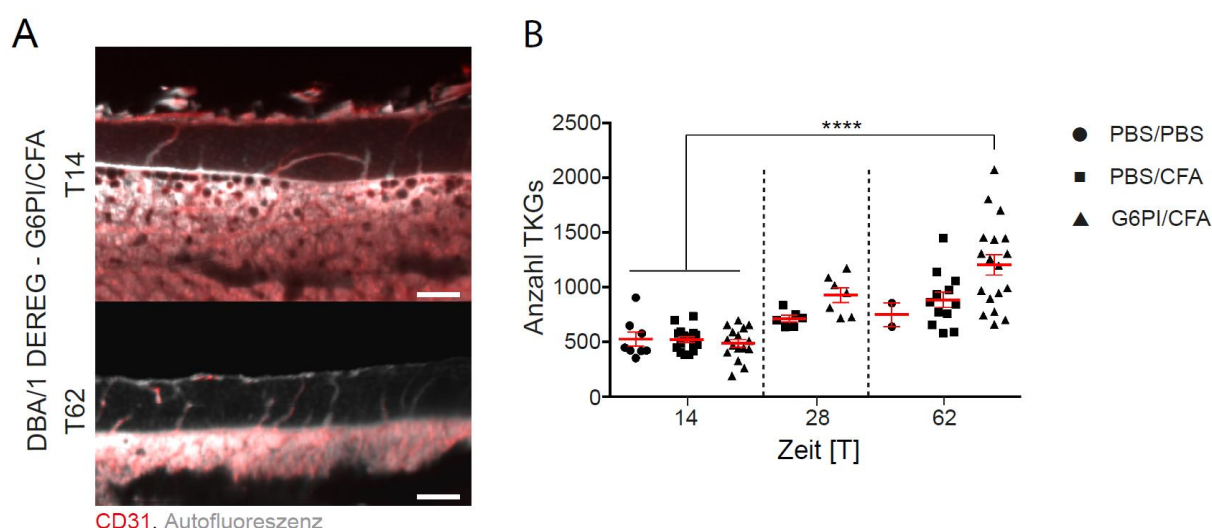


Abb. 36: Charakterisierung der Knochenvascularisierung bei der akuten und chronischen Arthritis

A) LSFM-Aufnahmen der DBA/1 DEREK Tibiae an Tag (T) 14 und Tag 62 nach der Induktion der Arthritis mittels G6PI/CFA zeigen die Zunahme der TKGs (CD31, rot) im kompakten Knochen (Autofluoreszenz, grau, Größenskalen = 100 μ m). (B) der zeitliche Verlauf der Arthritis geht mit einer hoch signifikanten Zunahme an TKGs einher. (Kruskal-Wallis H-Test, **** $p < 0,0001$, $n = 2-18$ Tibiae pro Gruppe und Zeitpunkt, insgesamt $n = 85$ Tibiae).

Die Auswertung der LSFM-Daten ergab, dass an Tag 14 nach Induktion der Arthritis die G6PI/CFA behandelte Versuchsgruppe mit $489,4 \pm 18,2$ TKGs pro Tibia dieselben Gefäßanzahlen wie die PBS/PBS- und PBS/CFA-behandelten Kontrollgruppen mit $526,9 \pm 32,1$ und $522,6 \pm 13,1$ TKGs aufwiesen. An Tag 28 war sowohl bei der PBS/CFA-Kontrollgruppe, als auch bei der G6PI/CFA-Gruppe eine Zunahme der TKGs in den DBA/1 DEREK-Tibiae zu beobachten. Die Gefäßzahlen stiegen bei der PBS/CFA-Gruppe auf $714,8 \pm 15,4$ und bei der G6PI/CFA-Gruppe auf $929,3 \pm 33,8$ Gefäße an. An Tag 62 nach der Arthritis-Induktion lag das Basallevel der TKGs bei den PBS/PBS-behandelten Kontrolltieren bei $750,0 \pm 53,5$ TKGs pro Tibia. Die PBS/CFA-behandelten Tiere wiesen sowohl zur PBS/PBS-Kontrollgruppe als auch zu den Tag 28 Werten mit $887,1 \pm 36,1$ TKGs pro Tibia keine signifikante Veränderung der Gefäße auf. Hingegen wiesen die G6PI/CFA-behandelten Tiere an Tag 62 mit durchschnittlich $1207 \pm 47,5$ Gefäßen pro Tibia eine signifikante Zunahme der TKGs gegenüber den Kontrollgruppen und einen hoch signifikanten Anstieg gegenüber den Ausgangswerten von Tag 14 auf. Mit 489 TKGs an Tag 14 zu 1207 TKGs an Tag 62 weisen die arthritischen Tibiae eine Zunahme um den Faktor 3 über die analysierte Zeit auf. Da aber auch die TKG-Anzahlen der Kontrollgruppen auf 750 für die PBS/PBS-Gruppe und 887 für die PBS/CFA-Gruppe ansteigen lag an Tag 62 zwischen diesen und der G6PI/CFA Gruppe ein unterschiedlicher Faktor von etwa 1,5 vor (Abbildung 36).

3.4 Die Vaskularisation humaner Röhrenknochen

Die Maus stellt einen etablierten Modellorganismus in der biologischen und klinischen Forschung dar. Um aber die erhobenen Daten und Befunde hinsichtlich des Gefäßsystems in Röhrenknochen auf seine Übertragbarkeit auf das humane System zu überprüfen, wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit auch Daten humaner Röhrenknochen erhoben.

So wurden Photographien und Videos von Röhrenknochen, die im Rahmen von Operationen freigelegt wurden, erstellt. Dabei waren sowohl auf dem Femur als auch auf der Fibula zahlreiche Poren und Gefäße zu erkennen, aus denen Blut austrat. Weitere Untersuchungen stellten 7,0 Tesla Magnetresonanztomographie-Aufnahmen (7T MRT) des humanen Unterschenkels dar. Dabei konnten neben der Muskulatur und dem kompakten Knochen auch Blutgefäße visualisiert werden. Neben sehr dominanten Gefäßen in der Wadenmuskulatur, bei denen es sich mutmaßlich um Venen und Arterien handelte, konnten auch Gefäße innerhalb des Röhrenknochens im Knochenmark lokalisiert werden. So war ein Gefäß, das in der Muskulatur verlief und dann durch den kompakten Knochen hindurch in das Knochenmark eindrang, zu beobachten. Anhand von Intensitätsunterschieden der von den Gefäßen generierten Signale, konnte auf die Fließrichtung des Blutes in diesen Strukturen zurück geschlossen werden. Daher wurde davon ausgegangen, dass es sich bei dem Gefäß, das in die Fibula eintrat, um eine Arterie handeln könnte. In der Tibia hingegen konnten zwei in ihrer Intensität verschiedene Gefäße identifiziert werden, die sich also auch vermutlich in ihrer Fließrichtung unterschieden. Diese verliefen beide parallel zum Knochenschaft wobei sie im oberen Abschnitt des detektierten Sichtfeldes nahe am Endost lokalisiert waren und im unteren Abschnitt eher zentral im Knochenmark verliefen. Während eines der beiden Gefäße, das mutmaßlich arteriell ist, sehr geradlinig verlief, wies das andere mutmaßlich venöse Gefäß eine sehr starke Verästelung im Knochenmark auf. Aufgrund der technischen Auflösungsgrenzen waren allerdings keine Gefäße im kompakten Knochen klar zu identifizieren (Abbildung 37, Video 16).

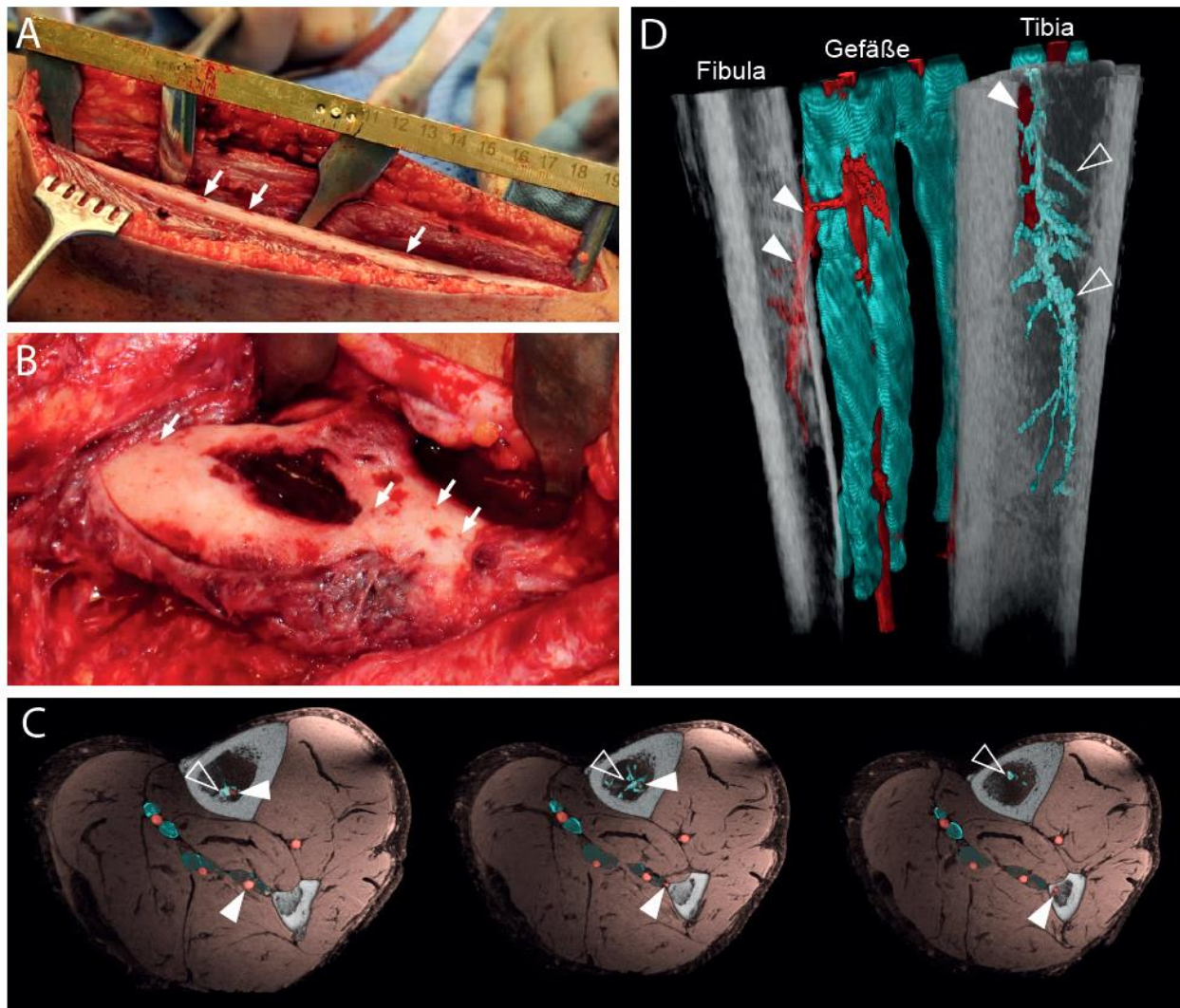


Abb. 37: Vaskularisation humaner Röhrenknochen

(A) Wenige Minuten nach Freilegung einer humanen Fibula sind zahlreiche Blutaustrittsstellen auf der Knochenoberfläche zu beobachten (weiße Pfeile). (B) Ebenso sind auf der Knochenoberfläche des humanen Femurs zahlreiche Blutaustrittsstellen nach Freilegung des Knochens zu beobachten (weiße Pfeile). (C) MRT Aufnahmen des humanen Unterschenkels im Querschnitt. Sowohl der kompakte Knochen (grau) der Tibia als auch der Fibula können detektiert werden. Gefäße die als mutmaßlich venös (blau) oder arteriell (rot) identifiziert wurden sind sowohl in der Muskulatur (braun) als auch im Knochenmark lokalisiert. Zentral im Knochenmark der Tibia verlaufen ein vermutlich venöses (blau, weiß umrandete Pfeilspitzen) und ein arterielles Gefäß (rot, weiße Pfeilspitzen), während ein potentiell arterielles Gefäß aus der Muskulatur in die Fibula eintritt (weiße Pfeilspitzen). (D) Seitenansicht der Blutgefäße und Knochen im humanen Unterschenkel. Es ist ein mutmaßlich arterielles Gefäß zu beobachten, dass durch den kompakten Knochen in die Fibula eintritt (weiße Pfeilspitzen). In der Tibia konnten zwei unterschiedliche Gefäße identifiziert werden. Diese verlaufen im oberen Abschnitt des Detektionsbereichs entlang des Endosts und im unteren Bereich des Sichtfeldes zentral im Knochenmark. Während das mutmaßlich arterielle Gefäß (rot, weiße Pfeilspitze) geradlinig verläuft weist das vermutlich venöse Gefäß (blau, weiß umrandete Pfeilspitze) zahlreiche Verästelungen im Knochenmark auf.

4 Diskussion

4.1 Potentielle Anpassungen des Ethanol-ECi basierten Verfahrens zur Optimierung der optischen Durchlässigkeit und des Fluoreszenzerhalts

Die Lichtblatt Mikroskopie, die 1902 von Zsigmondy und Siedentopf entwickelt wurde, fand erstmals 1993 durch Voie et al. Anwendung in der biologischen Forschung^{128,129}. Obwohl dieses Verfahren hinsichtlich seiner biologischen Anwendung somit vergleichsweise neu ist, wurden bereits zahlreiche Methoden zur Optimierung der optischen Durchlässigkeit, die für die mikroskopische Analyse von biologischen Geweben mittels Lichtblatt-Mikroskopie essentiell ist, etabliert. Diese können grundlegend in wasserbasierte Immersionsverfahren und hydrophobe lösungsmittelbasierte Verfahren unterteilt werden⁹⁵. Während sich die wasserbasierten Methoden ausschließlich für weiche, stark wasserhaltige Organe mit niedrigen RIs eignen, können die lösungsmittelbasierten Verfahren auch für harte Organe mit hohen RIs, wie Knochen, verwendet werden. Die somit für alle Organtypen geeigneten lösungsmittelbasierten Verfahren beruhten aber bisher auf gesundheitsschädlichen aromatischen Verbindungen und Gewebsdehydrierungen, für die teils toxische, karzinogene oder potentiell explosive Reagenzien wie THF verwendet wurden⁹⁵. Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurde Zimtsäureethylester (ECi) als neues hydrophobes Reagenz identifiziert und zum Patent angemeldet. Da ECi keinerlei der oben aufgeführten gefährdenden Eigenschaften besitzt, stellt es eine enorme anwenderbezogene Optimierung gegenüber den bestehenden Methoden dar. Die Anwendbarkeit dieses Verfahrens wurde in der Publikation „Fully automated evaluation of total glomerular number and capillary tuft size in murine nephritic kidneys using lightsheet microscopy“ anhand der RI-Anpassung von Nieren und Herzen für weiche Organe und an murinen Knochen als Beispiel für harte Organe gezeigt¹⁰⁷. Durch die reaktionsarmen Eigenschaften von ECi und die pH-Anpassung der Dehydrierungslösungen in den basischen Bereich, der die fluoreszent aktive deprotonierte Konformation von FPs unterstützt, kann ein langzeitiger Erhalt endogener FPs von mehreren Wochen erzielt werden¹¹³. Mit den bisher publizierten lösungsmittelbasierten Verfahren war der Erhalt der FPs bisher auf wenige Tage begrenzt, so dass das Ethanol-ECi Verfahren nun einen größeren Zeitrahmen zur Analyse der biologischen Proben und repetitive

Messungen ermöglicht ⁹⁵. Das hier angewandte Prinzip des FP-Erhalts anhand basischer pHs bei Methoden zur Optimierung der optischen Durchlässigkeit wurde 2015 auch durch eine andere Studie aus Heidelberg bestätigt ¹⁰².

Anhand der Lichtblatt Mikroskopie können große biologische Proben und ganze Organe bis zu einer Größe von 2 cm bei einer Auflösungsgrenze im Mikrometerbereich analysiert werden. Der Erhalt der morphologischen Strukturen ist dabei hinsichtlich der Analyse räumlicher Zellanordnungen oder der Größenanalyse definierter Strukturen essentiell. Dass das Volumen von Organen durch Fixierungsreagenzien beeinflusst wird, wurde bereits mehrfach beschrieben und auch in der eigens erstellten Publikation hinsichtlich muriner Nieren analysiert ^{107,130,131}. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Fixierung mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) in Phosphat-gepufferter Salzlösung (engl.: phosphate buffered saline, PBS) eine Gewebsschrumpfung von etwa 20 % bezogen auf den Organdurchmesser induziert. Dies entspricht den in der Literatur beschriebenen Effektgrößen für Gewebeschrumpfungen durch Formalin-basierte Fixierungen ^{131,132}. Neben der Gewebefixierung können aber auch die zur Angleichung der RIs verwendeten Reagenzien die Gewebsmorphologie beeinflussen. So wurde bei den wasserbasierten Immersionsverfahren das Aufquellen von Geweben, zum Beispiel bei der Immersion mittels *Scale* oder *SeeDB*, aber auch die Schrumpfung von Geweben bei der Immersion mit Sucrose beschrieben ⁹⁵. Hinsichtlich der lösungsmittelbasierten Verfahren konnten wir beobachten, dass durch die Ethanol- und auch Butanol-basierte Dehydrierung Gewebsschrumpfungen von etwa 30 % bezüglich der Organdurchmesser induziert werden. Die Prävention von Gewebsdeformierungen würde daher eine weitere Optimierung des etablierten Verfahrens hinsichtlich korrekter morphologischer Analysen darstellen.

Bezüglich der Gewebefixierung kann zwischen denaturierenden und vernetzenden Fixierungslösungen unterschieden werden. Die denaturierenden Fixierungslösungen, wie die Canoy'sche Lösung und die Bouin'sche Lösung, sind für die Anwendung in der Fluoreszenzmikroskopie ungeeignet, da durch die Denaturierung der in dem Gewebe enthaltenen Proteine endogen exprimierte FPs zerstört würden ¹³⁰.

Zu den vernetzenden Fixierungsreagenzien zählen PFA, Glutaraldehyd (GA) und Natriumperjodat Lysin Paraformaldehyd (engl.: periodate lysine paraformaldehyde, PLP). Während GA zwar gut die Morphologie biologischer Gewebe erhält, interagiert es jedoch sehr stark mit Proteinen und spaltet Antigen-Antikörper-Bindungen. Somit könnte dieses Fixierungsreagenz den Erhalt antikörperbasierter Fluoreszenzfärbun-

gen in den Geweben oder Organen negativ beeinflussen. Im Vergleich zu GA erhält PFA die Morphologie nicht ganz so gut, gewährleistet jedoch den Erhalt von Antikörper-basierten Fluoreszenzfärbungen und endogenen FPs. Allerdings kann es die Autofluoreszenz von Geweben stark erhöhen. Da durch die höhere Energie kurzwelliger Strahlung mehr autofluoreszente Strukturen angeregt werden, als mit energieärmeren längerwelligen Spektren, hat dies besonders im kurzwelligen Spektralbereich negative Auswirkungen auf die Detektion und Differenzierung von spezifischen Fluoreszenzsignalen gegenüber den autofluoreszenten Signalen. Hinsichtlich der Morphologieerhaltung ist PLP gleichwertig zu GA. Zwar enthält dieses ebenfalls PFA, allerdings in geringeren Konzentrationen als bei der reinen PFA-Fixierung üblich. Somit kann hier von einer reduzierten Autofluoreszenzverstärkung ausgegangen werden. Zusätzlich erhält es wie reines PFA die Antigenität der in den Geweben enthaltenen Strukturen und sollte somit ebenfalls den Erhalt von antikörperbasierten Färbungen und FPs gewährleisten¹³³. Die Effektgrößen einer PLP-basierten Gewebsfixierung gegenüber der PFA/PBS-basierten Fixierung hinsichtlich muriner Nieren müssten aber noch experimentell eruiert werden.

Neben den Effekten der Gewebsschrumpfung durch Fixierungs-Reagenzien müssen bei der Lösungsmittelbasierten Optimierung der optischen Durchlässigkeit auch die Effekte der an die Fixierung anschließenden Dehydrierungs-Reagenzien berücksichtigt werden. Bei diesen Verfahren treten ausschließlich Gewebsschrumpfungen durch die Dehydrierungsprozesse auf. Folglich stellen hier Quellreagenzien einen vielversprechenden Ansatz zur Vermeidung der Gewebsdeformation dar. Quellreagenzien können abhängig von ihrer Struktur Wasser oder organische Lösungen binden¹³⁴. Die wasserbindenden Reagenzien induzieren die Quellung von Geweben durch die Ausbildung stark hydratisierter Strukturen, wobei anionische Verbindungen, wie Natriumlaurylsulfat (engl.: sodium lauryl sulfate, SLS), stärkere Quelleigenschaften als kationische oder ungeladene Substanzen, wie Polyethylen(2)-sorbitanmonolaurat (engl.: Poly(oxyethylene 20 sorbitan) monolaurate, Tween® 20) oder [p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenoxy-poly-(oxyethylene) Glycerin] (Triton® X-100), aufweisen¹³⁵⁻¹³⁷. Allerdings sind die wasserbindenden Quellreagenzien für die hier vorliegende Problematik ungeeignet. Zwar könnten diese während der Dehydrierung den Schrumpfungseffekten des Ethanols entgegen wirken, bei der finalen Inkubation in reinem Ethanol würden aber die zusätzlich in dem Gewebe gebundenen Wassermoleküle vollständig aus diesem entfernt werden. Somit wäre bei den wasserbasier-

ten Quellmitteln kein nachweisbarer Effekt hinsichtlich der Prävention von Gewebeschrumpfungen zu erwarten.

Dementsprechend wären lediglich Quellmittel, die hydrophobe, organische Lösungsmittel binden, für die Wiederherstellung der Gewebsmorphologie nach der Ethanol-basierten Gewebsschrumpfung geeignet. Beispielsweise ist 1,3,5-Trimethylbenzol, auch als Mesitylen bezeichnet, im inneren hydrophoben Teil von Mizellen löslich und kann somit deren Volumen vergrößern¹³⁸. Mizellen bestehen aus amphiphilen Polymeren, die abhängig von ihrer chemischen Struktur kugelförmige, zylindrische oder scheibenartige Aggregate ausbilden können. Verfügen die einzelnen amphiphilen Moleküle jeweils über ein langes hydrophobes Ende oder zwei hydrophobe Enden, so bilden sie Vesikel aus. Deren Aufbau mit einer Lipid-Doppelmembran entspricht dem von Zellmembranen¹³⁹. Dementsprechend könnte 1,3,5-Trimethylbenzol mutmaßlich auch die Quellung von Zellmembranen induzieren. Allerdings ist dieses Reagenz toxisch und umweltgefährdend, so dass es dem Ansatz einer benutzerfreundlichen ungiftigen Methode zur Optimierung der optischen Durchlässigkeit mittels Ethanol und ECI zuwider laufen würde¹. Alternativ könnte sich das Öl des aus Brasilien stammenden Sucupira-Baums *Pterodon emarginatus* als nicht toxisches hydrophobes Quellmittel eignen. Die pharmazeutischen Wirkungen von Phytoextrakten und reinen Metaboliten, die aus dieser Pflanze gewonnen werden, sind hinsichtlich ihrer entzündungshemmenden oder anti-nozizeptiven Wirkung bereits umfassend beschrieben worden¹⁴⁰. Demzufolge handelt es sich bei dem Pterodon-Öl um eine gesundheitlich unbedenkliche Substanz. Darüber hinaus lassen sich auch mit diesem Öl Quellmechanismen bis zu einer anderthalbfachen Durchmesserzunahme bei Mizellen beobachten¹³⁸. Allerdings weist dieses Öl eine bernsteingelbe Farbe auf¹⁴¹. Inwiefern sich diese Färbung negativ auf die Transparenz der Organe auswirkt, oder ob erhöhte Absorptionen in den Geweben auftreten wäre experimentell zu untersuchen. So weist das in der Lösung BABB verwendete Benzylbenzoat eine leicht gelbliche Färbung auf, die im Rahmen der hier durchgeführten Studie allerdings weder die Transparenz noch die Absorption in biologischen Geweben beeinflusste^{11,107}.

Um eventuellen Einflüssen der Farbgebung des Sucupira-Öls vorzubeugen, würde sich zur Wiederherstellung der Gewebsmorphologie am besten ein zusätzlicher Inkubationsschritt zwischen der Ethanol-Dehydrierung und der RI-Anpassung mittels ECI eignen. Zum einen könnte eine zeitlich kontrollierbare Quellung der Proben ge-

währleistet werden und zum anderen könnte das Sucupira-Öl anhand der anschließenden Inkubation mit ECI aus den Proben entfernt werden. Dies würde den Erhalt des RIs von 1,56 von ECI und somit auch die gute Anpassung der RIs in den dehydrierten Proben garantieren. Ob sich das Sucupira-Öl vollständig mittels ECI aus dem Gewebe verdrängen lässt müsste aber ebenfalls experimentell überprüft werden. Des Weiteren ist zu beachten, dass die verschiedenen Organe individuelle Wasseranteile beinhalten und somit auch unterschiedlich stark schrumpfen. Folglich wäre für jedes murine Organ die optimale individuelle Quellzeit zu ermitteln.

Die Optimierung der optischen Durchlässigkeit mittels Ethanol und ECI ermöglicht die Visualisierung ganzer Organe, wie Herzen und Nieren, per LSFM. Dennoch weisen einige Organe, wie Herzen oder Lebergewebe, auch nach der Anpassung der RIs eine bräunliche Färbung auf. Dies ist durch das stark absorbierende, in den Geweben befindliche Melanin bedingt, das nicht transparent wird und sich weder durch Ethanol noch ECI entfernen lässt¹⁴². Zur Reduktion der Melanin-bedingten Absorption in biologischen Geweben wurde bereits im Zusammenhang mit Methoden zur Optimierung der optischen Durchlässigkeit die Verwendung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zur optischen Bleichung von Geweben beschrieben^{92,133}. Aufgrund seiner ätzenden und gesundheitsschädlichen Eigenschaften eignet sich Wasserstoffperoxid aber nicht zur Optimierung eines anwenderfreundlichen Verfahrens^{III}. Darüber hinaus wurde bereits beschrieben, dass H_2O_2 die Fluoreszenzintensität von Fluorochromen stark reduzieren kann (engl.: quenching)¹⁴³⁻¹⁴⁵. Folglich sollte die Anwendung von H_2O_2 im Zusammenhang mit allen fluoreszenzbasierten bildgebenden Verfahren vermieden werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass undurchsichtige Moleküle erfolgreich mittels Dichlormethan entfernt beziehungsweise gebleicht werden können. Dieses ist jedoch stark toxisch und zerstört darüber hinaus endogene Floreszenzen und ist daher für den hier angestrebten Ansatz ebenfalls ungeeignet^{IV,98}. In einer Studie von Shen und Wu aus dem Jahr 2015 wurde die erfolgreiche Bleichung von Melanin in biologischen Geweben mittels Trichlorisocyanursäure (engl.: trichloroisocyanuric acid, TCCA) gezeigt¹⁴⁶. Laut Herstellerangaben wirkt TCCA toxisch bei oraler Aufnahme und hautreizend, in der besagten Studie wird aber darauf hingewiesen, dass TCCA lediglich schwach toxisch sei und daher auch in der Lebensmittelindustrie eingesetzt werde^{V,146}. Folglich scheint die Dosis des TCCAs hinsichtlich der Toxizität entscheidend zu sein. Daher müsste experimentell überprüft werden, ob sich ganze Organe mit TCCA bleichen lassen und welche Konzentrationen und Inkubationszeiten angewandt werden müssten. Darüber hinaus müsste

auch der Einfluss von TCCA auf fluoreszente Antikörperfärbungen und den Erhalt endogener FPs überprüft werden. Dementsprechend lässt sich derzeit keine Aussage zu der Anwendbarkeit von TCCA zur Melanin-Bleichung im Zusammenhang mit der Optimierung der optischen Durchlässigkeit treffen.

Optimal wäre daher die Identifizierung einer völlig unbedenklichen Reagenzie zur Bleichung von Melanin in biologischen Geweben. Durch die daraus resultierende Reduktion der Absorption in diesen Geweben könnte eine höhere Eindringtiefe des Emissionslichtes, insbesondere bei kurzen Wellenlängen, erzielt werden. Dies würde eine deutlichere Abgrenzung und Identifizierung von Strukturen, die kurzwellige FPs wie ECFP, EGFP oder EYFP exprimieren oder mit kurzwelligen Fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt sind, ermöglichen und somit die Bildqualität in diesen Spektralbereichen bei der LSM optimieren.

4.2 Anwendung des etablierten Ethanol-ECi Verfahrens zur Optimierung der optischen Durchlässigkeit an weichen Organen

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde ein Verfahren zur Optimierung der optischen Durchlässigkeit mittels einer Ethanol-Dehydrierung und anschließender Anpassung des RIs mittels ECi entwickelt. Dieses Verfahren wurde vorerst an weichen Organen getestet, wobei die Detektierbarkeit endothelialer Strukturen und ihrer strukturellen Veränderungen bei entsprechenden Gewebeschädigungen mittels LSM überprüft werden sollte. Auch sollte ein Verfahren entwickelt werden, um quantitative Daten bezüglich der Endothelstrukturen aus den LSM-Daten generieren zu können. Als Modell zur Induktion von Endothelschädigungen in der murinen Niere wurde die nephrotoxische Nephritis gewählt, die Schädigungen in den Glomeruli, den funktionellen Einheiten der Nieren, induziert. Basierend auf diesen Versuchen entstand im Rahmen dieser Doktorarbeit eine separate, bereits publizierte Studie zur Quantifizierung von Glomeruli in murinen Nieren unter Einfluss einer nephrotoxischen Nephritis

¹⁰⁷.

In der Vergangenheit wurden bereits Studien durchgeführt, in denen mittels histologischer Schnitte die Schädigung der Organe bewertet und die Anzahl der Glomeruli über Näherungsrechnungen kalkuliert wurde ^{121,147,148}. Allerdings können bei der Anfertigung histologischer Schnitte strukturelle Schäden in Form von Stauchungen, Streckungen oder Rissen in den Schnitten, auftreten, so dass diese verworfen wer-

den müssen. Daher können auf histologischen Schnitten basierte 3D-Modelle fehlerbehaftet sein. Darüber hinaus ist die Generierung von 3D-Rekonstruktionen anhand von histologischen seriellen Gewebeschnitten sehr zeitaufwändig ⁹⁴. Daher stellt hier die LSFM eine Alternativmethode zur vollständigen Analyse gesamter Nieren, ohne die Anfertigung von Gewebeschnitten, dar. Neben der Vermeidung von Schnittartefakten konnte auch eine maßgebliche Zeitersparnis gegenüber konventionellen Methoden erzielt werden. So konnte im Rahmen dieser Studie gezeigt werden, dass für die Probengenerierung und Analyse gesamter Nieren pro Organ insgesamt rund 24 Stunden, aber lediglich ca. 45 Minuten aktiver Arbeitszeit, benötigt werden.

Aufgrund der Dehydrierung, die der Anwendung lösungsmittelbasierter Reagenzien zur Optimierung der optischen Durchlässigkeit vorausgeht, erhöht sich der refraktive Index biologischer Proben. So weisen dehydrierte Proteine einen RI > 1,5 auf, weshalb sich ECI nicht nur als Reagenz zur optischen Klärung von murinen Knochen, sondern auch für andere, ursprünglich wasserhaltige Organe, wie Nieren, mit niedrigem RI eignet ⁹⁵.

In Kombination mit fluoreszent markierten Antikörpern konnten vaskuläre Strukturen, wie die glomerulären Kapillaren, in ganzen Nieren mittels CLSM, TPLSM und LSFM visualisiert und analysiert werden. Die charakteristische runde Form und die Größe der Glomeruli ermöglichte dabei die Etablierung eines Algorithmus zur vollautomatisierten Quantifizierung und Charakterisierung dieser Strukturen. Somit konnte anhand der LSFM in Kombination mit der entwickelten Auswertemethode eine zeitlich und qualitativ optimierte Analyse der Gesamtzahlen und Volumina der Glomeruli in gesunden und NTN-geschädigten Nieren zu verschiedenen Zeitpunkten erhoben werden. 302.023 Glomeruli konnten in 23 Nieren einzeln detektiert und quantifiziert werden, wobei eine einzelne gesunde Niere durchschnittlich ca. 15000 Glomeruli enthielt, was den histologisch kalkulierten Literaturwerten entspricht ^{120,149,150}.

Die LSFM bot dabei mit über 1000 Voxeln pro Glomerulum eine rund 40-fach höhere Auflösung als Vergleichsmethoden wie die Magnetresonanztomographie, was eine deutlich präzisere Separierung der Glomeruli vom umgebenden Nierengewebe und Größenanalyse der Glomeruli ermöglichte. Darüber hinaus konnten mit diesem Verfahren Aussagen zur Lokalisation und der Morphologie der induzierten Gewebeschädigungen im gesamten Organ getroffen werden. Diese äußerten sich durch CD31-negative Areale im Nierengewebe, die auf eine Endothelschädigung hindeuten, die wiederum eine Gewebenekrose induzieren können. Des Weiteren äußerten

sich die NTN-basierten Nierenschädigungen in der Schrumpfung der Glomeruli, die durch die Schädigung der Basallamina, sowie Endothelschädigungen bedingt sein könnte.

Die Visualisierung der gesamten Niere mittels LSM ermöglicht somit auch weiterführende Analysen hinsichtlich immunologischer und struktureller Aspekte, was mit den üblichen Verfahren wie der Gewebshistologie und der Durchflusszytometrie nur begrenzt möglich ist. So können mittels durchflusszytometrischer Messungen zwar quantitative Aussagen zu definierten Zellpopulationen getroffen werden, aber keine Analysen zu deren Lokalisation.

Damit könnte beispielsweise die Rolle von dendritischen Zellen und ihre potentiellen Interaktionen mit CD4⁺ Th1 Zellen während der NTN-induzierten Glomerulonephritis lokalisiert und analysiert werden. Es wurde bereits beschrieben, dass die Anzahl an CD11c⁺, CD11b⁺ dendritischen Zellen während einer NTN in der Niere zunimmt. Diese weisen eine erhöhte MHC II Expression auf, weshalb eine Interaktion mit CD4⁺ T-Zellen vermutet wurde. Darüber hinaus wurde ein protektiver Effekt der dendritischen Zellen durch die Induktion der Interleukin-10-Expression in Th1 Zellen vermutet¹²¹. Die Effekte der Gewebeschädigungen wurden hier mittels histologischer Schnitte untersucht. Untersuchungen mittels LSM würden hier morphologische Aussagen zu den Gewebsschädigungen, wie beispielsweise einer homogenen oder lokalen Schädigung, so wie der Größe und Anzahl geschädigter Areale, ermöglichen. Durch die Verwendung geeigneter transgener Mauslinien, wie der CX3CR1-EGFP oder der CD11cDTR/GFP Maus, oder durch Antikörperfärbungen könnten verschiedene Immunzellpopulationen visualisiert werden^{110,112}. Dies würde die Quantifizierung infiltrierender Zellen, ihre Lokalisation hinsichtlich der Gewebeschädigungen und Interaktionen der visualisierten Zelltypen ermöglichen. Somit könnten neue Erkenntnisse hinsichtlich der Pathogenese der NTN-induzierten Glomerulonephritis erzielt werden.

Darüber hinaus konnte im Rahmen dieser Studie gezeigt werden, dass neben den Nieren auch andere weiche Organe wie Herzen, aber auch harte Organe wie Knochen mittels ECI transparent gemacht werden können. Somit ermöglicht dieses Verfahren Organ-übergreifende Studien, wie beispielsweise die Untersuchung von Herzerkrankungen, die mit chronischem Nierenversagen assoziiert sind¹⁵¹. Durch die Anwendung von Antikörperfärbungen oder geeigneten transgenen Mauslinien könnten neben potentiellen vaskulären Schädigungen auch infiltrierende Immunzel-

len in den jeweiligen Organen identifiziert und lokalisiert werden, wie es beispielsweise in einer Publikation unseres Instituts gezeigt wurde ¹⁵².

In Bezug auf diese Doktorarbeit zeigte diese Studie, dass sich die LSFM zur Visualisierung und Analyse von Endothelstrukturen eignet und auch Gewebeschädigungen detektieren kann. Darüber hinaus können die mittels LSFM erhobenen Daten sowohl für manuelle als auch für voll automatisierte quantitative Analysen ganzer Organe genutzt werden. Folglich stellt dieses Verfahren neue Möglichkeiten zur Analyse spezifisch markierter Strukturen in ganzen Organen bei subzellulärer Auflösung zur Verfügung, die bisherige Methoden wie MRT, CT oder Elektronenmikroskopie nicht liefern konnten. Insbesondere da sich das hier entwickelte Verfahren zur Optimierung der optischen Durchlässigkeit bei Erhalt endogener Fluoreszenzproteine und der möglichen Kombination mit fluoreszent markierten Antikörpern für weiche und harte Organe anwenden lässt, eignet es sich für verschiedenste biologische und klinische Fragestellungen.

4.3 Aufklärung des Blutgefäßsystems in murinen Röhrenknochen

Das zentrale Ziel dieser Doktorarbeit war die Aufklärung des Blutgefäßsystems und der schlüssige Nachweis eines geschlossenen Blutkreislaufs in murinen Röhrenknochen anhand der nachgewiesenen Strukturen. Dazu wurden verschiedene bildgebende Verfahren, wie ELMI, LSFM, CLSM und TPLSM genutzt.

4.3.1 Anwendung der Elektronenmikroskopie zur Visualisierung der Knochenoberfläche

Bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Knochenoberfläche zeigten sich verschiedene Poren, die sich hinsichtlich ihres Durchmessers unterschieden. So lagen Poren mit etwa 10 µm Durchmesser, sowie Poren mit weniger als 1 µm Durchmesser vor. Bei den etwa 10 µm großen Poren konnten in diesen befindliche Erythrozyten beobachtet werden. Daher handelte es sich mutmaßlich um Blutgefäßkanäle, die so allerdings noch nicht bei Mäusen beschrieben worden waren. Des Weiteren waren diese Blutgefäßporen mit Furchen in der Knochenoberfläche assoziiert. Zwar konnten bei den erstellten ELMI-Aufnahmen keine Blutgefäße auf der Knochenoberfläche gezeigt werden, es ist aber anzunehmen, dass die in den Knochen eintretenden oder aus dem Knochen austretenden Gefäße entlang dieser Furchen

am Knochenschaft verlaufen und sich dann mit dem periostalen Gefäßnetzwerk verbinden.

Bei den kleinporigen Kanälen handelt es sich hingegen mutmaßlich um Kanalikuli an der Knochenoberfläche, die Poren, über die die Osteozyten miteinander in Verbindung stehen. Diese weisen einen Durchmesser von 100-500 nm auf und würden somit den identifizierten Strukturen auf den hier erstellen ELMI-Aufnahmen entsprechen⁶. Auffällig war, dass die sehr kleinen Poren in größeren Gruppen in Vertiefungen auf der Knochenoberfläche auftraten. Da bereits beschrieben wurde, dass Osteozyten über die Kanalikuli mit den Knochenoberflächenzellen und aktiven Osteoblasten des Periosts über Zell-Zell-Kanäle in Verbindung stehen und über die Ausschüttung von RANKL, IGF, Stickoxiden, Prostaglandin oder Sclerostin die Knochenaufbauprozesse regulieren können, könnte es sich hier um die entsprechenden Kontaktstellen handeln^{5,13,20,26,52}.

Auch die Furchen in der Knochenoberfläche, die mit Blutgefäßporen assoziiert sind, weisen zahlreiche Kanalikuli auf. Die Kanalikuli sind mit interstitieller Flüssigkeit gefüllt, die im Kanalsystem der Kanalikuli fließt und dem Transport von biochemischen Signalstoffen, die die Knochenauf- und -abbauprozesse regulieren, dient⁵². Zwar ist bereits umfangreich beschrieben worden, dass Gefäßkanäle im kompakten Knochen zahlreiche Verbindungen zu den Kanalikuli aufweisen, entsprechende Studien zu Gefäßen auf der Knochenoberfläche scheinen aber nicht vorzuliegen¹⁵³. Da Osteozyten primär auf mechanische Reize des interstitiellen Flusses reagieren, wäre es denkbar, dass diese nicht nur durch mechanische Belastungen des Knochens sondern auch durch die Kontraktionen und Dilatationen von Gefäßen ausgelöst werden. Andererseits könnte der direkte Kontakt mit den Blutgefäßen insbesondere auf der Knochenoberfläche die Weitergabe von Signalstoffen aus dem interstitiellen Fluid in die generelle Blutzirkulation und somit eine möglichst schnelle Stimulation des Systems gewährleisten. So ist bereits beschrieben worden, dass die Ausschüttung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren durch Osteozyten Knochenumbauprozesse und die Homöostase regulieren kann^{26,43}. Folglich könnte durch Veränderungen in der Vaskularisation des Endosts, des kompakten Knochens und des Periosts die Kommunikation zwischen den Osteozyten und anderen Immunzellen über das interstitielle Fluid und die Blutzirkulation beeinflusst werden.

4.3.2 Anwendung des ECI-Ethanol Verfahrens an murinen Knochen

Es konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit gezeigt werden, dass sich mittels des neu entwickelten Ethanol-ECi Verfahrens sowohl flache Knochen als auch Röhrenknochen transparent machen lassen. Dies ist eine entscheidende Verbesserung gegenüber kürzlich publizierten Arbeiten zur 3D-Struktur des Knochenmarks^{87,97}. Während der kompakte Knochen bei diesem Verfahren glasklar wird, erscheint das Knochenmark allerdings rötlich. Da die Tiere perfundiert werden und somit die hämoglobinhaltigen Erythrozyten aus dem Organ entfernt werden, scheiden diese als Ursache für diese rötliche Färbung aus. Folglich resultiert die rötliche Färbung des Knochenmarks in der Erythropoese, die von hämatopoetischen Stammzellen in der Knochenmarkmatrix ausgeht^{2,154}. Bei der Optimierung der optischen Durchlässigkeit der verschiedenen Knochen zeigte sich eine stark rötliche Knochenmarksfärbung in großen Röhrenknochen wie der Tibia und dem Femur, während kleine Röhrenknochen wie die Metatarsen und Phalangen der Pfoten vollständig glasklar wurden. Dies könnte optische Rückschlüsse auf die Aktivität des jeweiligen beinhalteten Knochenmarks hinsichtlich der Erythropoese und somit der Hämatopoese zulassen. Es ist bekannt, dass HSCs an der endostalen Knochenoberfläche lokalisiert sind und von ihnen gebildete Vorläuferzellen mit zunehmender Differenzierung zu den Blutgefäßen im Zentrum des Knochenmarks wandern und teilweise sogar Kontakte mit dem sinusoidalen Endothel eingehen können^{87,155}. Da im Rahmen dieser Doktorarbeit gezeigt wurde, dass alle Röhrenknochen über dieselbe Organisation der osseären Vaskularisation verfügen, können Gefäßunterschiede als Ursache für die vermeintlich unterschiedliche Erythropoese der verschiedenen Röhrenknochen ausgeschlossen werden. Somit könnte die individuelle zelluläre Zusammensetzung des Knochenmarks Einfluss auf die Erythropoese und die daraus resultierende rötliche Färbung des Knochenmarks haben. Diese scheint aber insbesondere hinsichtlich des Vergleichs verschiedener Röhrenknochen nicht aufgeklärt zu sein und könnte jetzt beispielsweise über durchflusszytometrische Analysen sowie mittels diverser bildgebender Verfahren wie der LSM und TPLSM untersucht werden. So könnte vermutet werden, dass es sich bei den rötlichen Arealen, welche neben den großen Röhrenknochen auch in flachen Knochen wie der Calvaria zu beobachten waren, um rotes Knochenmark handelt, während in den kleinen Röhrenknochen der Pfoten eher gelbes Knochenmark vorliegt. Dieses ist weniger hämatopoetisch aktiv und enthält stattdessen mehr Adipozyten². Anhand der LSM Aufnahmen ist davon auszugehen, dass deutlich mehr Fettzellen oder Adipozyten-ähnliche Zellen in den Knochen

der Pfoten vorlagen. Diese erscheinen bei dieser Mikroskopietechnik als ungewöhnlich große, nahezu kreisrunde, leere Strukturen. Diese charakteristische Form ist bereits vielfach in der Histologie beschrieben worden, weshalb auch ohne direkte Antikörperfärbung angenommen werden kann, dass es sich bei den LSM-Aufnahmen um diesen Zelltyp handelt^{2,156}. Folglich könnte das Ethanol-ECi-Verfahren neben der mikroskopischen Anwendung auch für makroskopische Untersuchungen, die Hinweise auf die hämatopoetische Aktivität des enthaltenen Knochenmarks liefern, genutzt werden.

Für die im Rahmen dieser Studie durchgeführten Untersuchungen mittels LSM, CLSM und TPLSM stellte die rötliche Knochenmarksfärbung aber keinen limitierenden Faktor dar. Im Gegenteil wurde der Erhalt des Hämoglobins gezielt für grundlegende optische Analysen der Knochenvascularisation genutzt. Wurde auf die Perfusion bei der Probengenerierung verzichtet, so konnten blutgefüllte, rötliche Gefäße im glasklaren kompakten Knochen ausgemacht werden. Diese optischen Befunde deckten sich mit den per LSM detektierten Endothelstrukturen im Röhrenknochen.

Um bei zukünftigen Studien die Bildqualität des Knochenmarks zu optimieren, beziehungsweise die mögliche Absorption von Exzitationslicht durch hämoglobinhaltige Zellen zu limitieren, könnte das Verfahren, wie bereits diskutiert, weiter optimiert werden.

4.3.3 Identifikation des Blutgefäßsystems in der murinen Tibia

Durch die Etablierung von spezifischen Antikörperfärbungen in Kombination mit dem Ethanol-ECi-Verfahren konnten venöse und arterielle Gefäße in der murinen Tibia identifiziert und mittels LSM im gesamten Röhrenknochen visualisiert werden. Dies war mit bisher verfügbaren Methoden nicht möglich gewesen, da die Blickdichtigkeit des kompakten Knochens die optische Eindringtiefe fluoreszenzbasierter Verfahren maßgeblich limitiert hat. Die wesentlich größeren Eindringtiefen, die durch die Optimierung der optischen Durchlässigkeit erzielt werden können, ermöglichten die Visualisierung und Analyse von Knochenstrukturen mittels verschiedener bildgebender Verfahren wie der LSM und TPLSM. Somit konnte erstmals die Komplexität der osseären Vascularisation in seiner Gesamtheit untersucht werden.

Basierend auf den konträren Konzepten zur Vascularisation des Knochenmarks wurden die Hauptgefäße, die in den Knochen ein- und austreten, sowie ihre Verläufe im

Knochenmark untersucht. Es konnte ein sinusoidales Gefäßnetzwerk im Knochenmark identifiziert werden, welches mit einem zentralen Hauptsinus verbunden ist. Dabei konnte erstmals der Verlauf dieses Sinus durch den gesamten Knochen visualisiert und zwei Austrittsstellen in C57BL/6J Tibiae identifiziert werden. Hinsichtlich der arteriellen Hauptgefäße (NA) ergab sich eine Kombination der bestehenden Konzepte. Es konnte sowohl eine einzelne NA identifiziert werden, die an der Diaphyse in den Knochen eindringt, sowie zahlreiche NAs, die an der Metaphyse in den Knochen eintreten. Entgegen der bestehenden Konzepte verlief die NA an der Diaphyse allerdings nicht parallel zu dem austretenden Sinus. Dieser tritt unter anderem an der anterioren Seite der Tibia aus, während die NA posterior und etwas proximaler als der Sinus in den Knochen eindringt. Während die zweite Austrittsstelle des Hauptsinus posterior an der Metaphyse lokalisiert ist, treten die NAs an der Metaphyse an allen Seiten des Knochens in diesen ein.

Zwar wurde bereits mehrfach ein dichtes arterielles Gefäßnetzwerk an der Metaphyse und entlang der Diaphyse gezeigt, aber bisher noch nie der entsprechende Gefäßverlauf durch den gesamten Knochen^{16,56,122}. So konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit gezeigt werden, dass die NAs parallel zum Knochenschaft und zentralen Sinus im Knochenmark verlaufen und sich dort immer weiter verzweigen je mehr sie sich dem Endost annähern. Auch war der Übergang vom arteriellen in das venöse Gefäßsystem im murinen Knochen bisher unklar. Erst kürzlich wurde von Sivaraj und Adams ein Konzept vorgestellt, dem zu folge Arterien am Endost entlang verlaufen und sich ausschließlich an der Metaphyse mit dem sinusoidalen Gefäßnetzwerk verbinden⁴⁷. Im Gegensatz dazu wurde ebenfalls erst kürzlich ein Konzept von Acar et al. vorgestellt, das den Übergang von Arterien zu den Sinusoiden am Endost beschreibt. Dieses basierte aber lediglich auf indirekten Gefäßidentifikationen anhand der unterschiedlich starken Laminin-Expression von Arterien im Vergleich zu Venen⁸⁷. Eine direkte Identifikation der Blutgefäße mittels spezifischer Färbungen lag nicht vor, weshalb entsprechende methodische Artefakte wie Belichtungs-Inhomogenitäten, die die Interpretation der erstellten Aufnahmen beeinflussen könnten, nicht ausgeschlossen werden können. Auch wurde hier nur ein Teil der Diaphyse untersucht, so dass das Konzept eines geschlossenen Blutkreislaufs im murinen Röhrenknochen hier unvollständig blieb. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde somit erstmals das Blutgefäßsystem im gesamten Röhrenknochen dargestellt, wobei anhand spezifischer Antikörperfärbungen eindeutig zwischen Venen (CD31⁺/Sca-1⁻) und Arterien (CD31⁺/Sca-1⁺) unterschieden und die Verbindungen dieser Gefäße im

gesamten Knochen nachgewiesen werden konnten. Mittels verschiedener bildgebender Verfahren konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu den bisher erstellten Konzepten sowohl in der Metaphyse als auch in der Diaphyse am Endost Verbindungen von Arterien zu den venösen Sinusoiden bestehen.

Darüber hinaus ließen alle bisher vorliegenden Studien die hier erstmals beschriebene umfassende Vaskularisation des kompakten Knochens mit TKGs bei der Erstel-

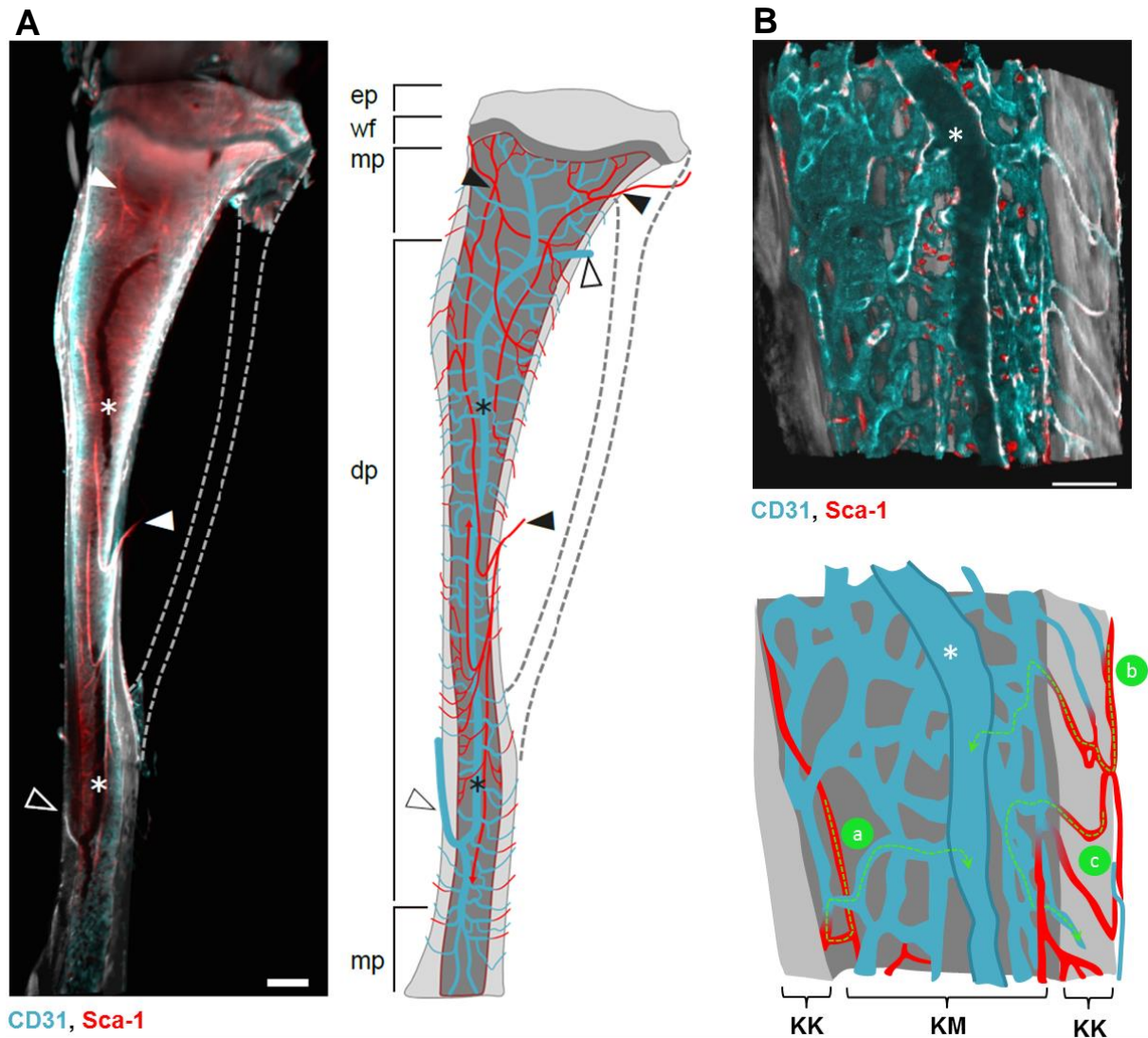


Abb. 38: Konzept des geschlossenen Blutkreislaufs im murinen Röhrenknochen

(A) LSFM-Aufnahme und konzeptioneller Aufbau der Hauptgefäße einer C57BL/6J Tibia. Es liegt ein zentraler Sinus (ZS, Stern) vor, bei dem es sich um ein venöses Gefäß (blau) handelt. Dieses tritt an zwei Stellen aus der Tibia aus (leere Pfeilspitzen). Im Gegensatz dazu treten eine Hauptarterie (NA, rot) an der Diaphyse (dp) und zahlreiche NAs an der Metaphyse (mp) in den Knochen ein. Diese verlaufen parallel zum Knochenschaft und dem ZS (weiße/schwarze Pfeilspitzen). Zusätzlich verbinden TKGs, die sowohl arteriell als auch venös sein können, das Knochenmark mit der generellen Blutzirkulation. Gestrichelte Linie = Fibula, Größenbalken = 1000 μ m (B) CLSM und TPLSM Aufnahme der C57BL/6J Fibula. In der murinen Fibula zeigen sich dieselben Gefäßstrukturen wie in der Tibia. Arterien, die am Endost entlanglaufen können dort Verbindungen mit dem Sinusnetzwerk ausbilden, so dass das Blut über diese zum ZS (weißer Stern) transportiert wird (a). Auch kann Blut über arterielle TKGs (b) durch den kompakten Knochen zum Knochenmark transportiert werden, wo es über Verbindungen mit dem Sinusnetzwerk zum ZS transportiert wird und über diesen wieder aus dem Knochen austritt. Da die TKGs auch venös sein können besteht die Möglichkeit, dass arterielles Blut bei der Verbindung mit dem Sinusnetzwerk über diese TKGs wieder aus dem Knochen transportiert wird (c). Deutlich seltener sind endostale Arterien zu beobachten, die als arterielle TKGs die Knochenmarkzirkulation mit der generellen Blutzirkulation verbinden. Die TKGs sind an der Knochenoberfläche mit dem periostalen Netzwerk verbunden, von wo aus das Blut der generellen Blutzirkulation zu- und abfließen kann. Größenbalken = 100 μ m

lung von Konzepten zum Blutgefäßkreislauf des Röhrenknochens vollständig außer Acht. Dabei konnte anhand der LSM-Untersuchungen von Röhrenknochen im Rahmen dieser Doktorarbeit ein komplexes Gefäßsystem im kompakten Knochen identifiziert werden. Bei den hier identifizierten Gefäßen, die als TKGs bezeichnet werden, handelt es sich sowohl um arterielle als auch venöse Gefäße, die einen durchschnittlichen Durchmesser von etwa 11,5 µm aufweisen. Da diese Gefäße bisher nicht beschrieben wurden, könnte an der Unzugänglichkeit des extrem festen Knochens liegen. Da die optische Eindringtiefe der fluoreszenzbasierten Mikroskopieverfahren im kompakten Knochen stark limitiert ist, wurden wenn überhaupt bisher primär histologische Untersuchungen durchgeführt. Aufgrund der geringen Schnittdicke der histologischen Präparate könnten die TKGs dabei schlicht übersehen worden sein oder aber es waren lediglich Fragmente ersichtlich, die keine Aussage zum vollständigen Verlauf durch den Knochen ermöglicht hätten^{9,13,16,56,57,106,122,157}. Andere Verfahren, wie µCT-Untersuchungen des kompakten Knochens, ermöglichten zwar die dreidimensionale Darstellung von Kanälen im murinen und humanen Knochen, allerdings erscheinen diese bei diesem Verfahren als Hohlräume. Und auch die Applikation von Kontrastmitteln zur Visualisierung von Blutgefäßen lieferte keine schlüssigen Ergebnisse im kompakten Knochen. Somit konnten hier ebenfalls keine schlüssigen Aussagen zu enthaltenen Gefäßen oder gar Identifikationen von Arterien oder Venen getroffen werden^{69,70,158,159}. Folglich könnten diese Strukturen aufgrund ihrer mangelnden Charakterisierung bei den aktuellen Konzepten zum Blutgefäßsystem im Knochen schlicht ignoriert worden sein.

Obwohl diese Gefäße bisher kaum Beachtung fanden, machen sie aufgrund ihrer enorm hohen Anzahl von über 900 TKGs pro C57BL/6J Tibia im kompakten Knochen 88,35 % der Gesamtquerschnittsfläche aller Blutgefäße, die das Knochenmark durch den kompakten Knochen mit der generellen Blutzirkulation verbinden, aus. Die verbleibenden 11,65 % der Gesamtquerschnittsflächen beziehen sich dabei auf die NAs die in den Knochen eindringen, so wie die beiden identifizierten Austrittsstellen des zentralen Hauptsinus. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich die TKGs, unabhängig davon ob es sich um Arterien oder Venen handelte, am Endost mit dem sinusoidalen Gefäßnetzwerk verbanden. Darüber hinaus konnte vereinzelt beobachtet werden, dass Arterien, die am Endost verliefen, in TKGs übergingen. Somit konnte erstmals ein geschlossener Blutkreislauf, der die Vaskularisation des Knochenmark und des kompakten Knochens umfasst, in der murinen Tibia identifiziert und zu einem schlüssigen System vereinigt werden. Weitere Untersuchungen anderer Röh-

renknochen zeigten, dass das so erstellte Konzept auch auf diese Knochen übertragbar war, wobei sich die Anzahlen der TKGs, NAs und Austrittsstellen des Sinus jedoch von denen der Tibia unterschieden.

Aufgrund der enorm hohen Gefäßanzahl der TKGs pro C57BL/6J Tibia muss angenommen werden, dass diese Gefäße einen essentiellen Anteil am Blutfluss in Röhrenknochen haben. Daher wurden auch intra-vitale zwei-photonenmikroskopische Untersuchungen zur Ermittlung der Fließgeschwindigkeiten in den verschiedenen identifizierten Gefäßtypen durchgeführt. Die noch ausstehenden Analysen sollen dabei den Volumenstrom durch die jeweiligen Gefäße möglichst exakt quantifizieren. Somit könnte der Anteil, den die TKGs an dem Gesamtblutfluss in C57BL/6J Tibiae haben, aufgeklärt werden (Abbildung 38). Auch wenn diese Analysen noch ausstehen ist anhand der bereits vorliegenden Daten klar, dass ein schlüssiges Konzept zum Blutkreislauf im Röhrenknochen nur unter Einbeziehung der TKGs möglich ist.

Da unter Applikation von G-CSF, als Stimulus zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, beobachtet werden konnte, dass die Zellen nicht nur durch den zentralen Hauptsinus sondern auch durch die TKGs und sogar gegen den Blutstrom aktiv durch TKGs aus dem Knochen auswandern können, kann die Ermittlung des Anteils des TKG-Blutstroms hier ebenfalls weitere Erkenntnisse zur Mobilisierung von Immunzellen und HSCs ermöglichen. So wurde bereits beschrieben, dass die Rekrutierung von Immunzellen, insbesondere von neutrophilen Granulozyten, durch einen Stimulus in die generelle Blutzirkulation innerhalb eines sehr kurzen Zeitfensters von wenigen Minuten erfolgt ⁷⁴. Anhand der hier erzielten Erkenntnisse können somit Rückschlüsse auf die strukturellen Aspekte dieser sehr schnellen Zellrekrutierung geschlossen werden und somit dieses Phänomen erklärt werden. Des Weiteren stellt der intraossäre Zugang eine gängige Alternativmethode zu intravenösen Zugängen in der Notfallmedizin dar. Die intraossäre Infusion liefert dabei dieselben pharmakokinetischen Parameter wie eine intravenöse Infusion, wobei die entsprechende Funktionsweise bisher unklar war ^{82,83}. Durch die Aufklärung des geschlossenen Blutgefäßsystems im Röhrenknochen, so wie durch die Kalkulation des Volumenstroms könnten entsprechende Vergleiche zur Vaskularisation und Blutstroms anderer Organe und Gewebe und somit zur Transportleistung des Röhrenknochens im Vergleich zu anderen Systemen erhoben werden.

Des Weiteren war bezüglich der Vaskularisation des kompakten Knochens eine inhomogene Verteilung der TKGs entlang der Tibia zu beobachten, da in der proxima-

len Knochenhälfte wesentlich mehr TKGs als in der distalen Knochenhälfte und posterior mehr TKGs als anterior lokalisiert waren. Auch veränderten sich die Verlaufsrichtungen der TKGs entlang der Knochenachse. In der oberen Tibiahälfte waren die TKGs primär distal orientiert, während sie in der unteren Tibiahälfte proximal orientiert waren. Dies könnte auf die embryonale Knochenentwicklung zurück zu führen sein. Laut der aktuellen Modelle bildet sich bei der chondralen Ossifikation ein zentrales Ossifikationszentrum aus, in das mittig ein Hauptgefäß eindringt ^{2,11,44-46}. Daher könnte die zum Knochenzentrum ausgerichtete TKG-Ausrichtung darauf hindeuten, dass sich die nachfolgend entstandenen Gefäße ausgehend von diesem zentralen Punkt entwickelt haben. Da bisher der geschlossene Blutkreislauf des adulten Röhrenknochens widersprüchlichen Konzepten unterlag ist jedoch fraglich, inwiefern das entsprechende Konzept der embryonalen Knochenentwicklung den tatsächlichen Gefäßstrukturen und ihrer Ausbildung während der Embryogenese entspricht. So wird auch bei diesen Konzepten kein geschlossener Blutkreislauf berücksichtigt oder die Vaskularisation des kompakten Knochens beschrieben.

Des Weiteren lagen hinsichtlich der TKGs strukturelle Unterschiede bezüglich ihres Verlaufs innerhalb des kompakten Knochens vor, die im Rahmen dieser Doktorarbeit umfassend untersucht wurden. So konnten vier verschiedene Formen von TKGs, geradlinig durch den Knochen verlaufende TKGs (dTKGs), gegabelte TKGs (gTKGs), komplex verzweigte TKGs (kTKGs) und im kompakten Knochen Schleifen bildende TKGs (intra-kortikale Schleifen, IKS), identifiziert werden. Dabei machten die dTKGs 92,7 % aller TKGs aus. Die dTKGs wurden daher detaillierter untersucht, wobei sich Verlaufsänderungen dieser Gefäße durch den kompakten Knochen zeigten. Demnach lag eine lineare Korrelation der dTKGs hinsichtlich ihrer Geradlinigkeit durch den kompakten Knochen zur Knochendicke vor. Je dicker der kompakte Knochen wurde, desto häufiger änderten die dTKGs ihre Verlaufsrichtung zwischen Endost und Periost. Dies könnte zum einen auf Umbauprozesse des Knochens während der Gefäßausbildung zurückzuführen sein, oder der Nährstoffversorgung des Knochens dienen. Denn es war auffällig, dass in den besonders dicken Knochenarealen auch eine Häufung der kTKGs vorlag. Da die Osteozyten homogen im kompakten Knochen verteilt sind, müssen bei dickeren Knochenabschnitten mehr Zellen versorgt werden als in dünneren Knochenabschnitten ¹⁶⁰. Dies könnte über die stärkere Vaskularisation gewährleistet werden. Doch auch die Festigkeit des Knochens, die eine zentrale Rolle hinsichtlich der mechanischen Belastbarkeit spielt, korreliert mit der Knochendicke. Da die Blutgefäße eine geringere Belastbarkeit als der kalzifizier-

te kompakte Knochen aufweisen, senken sie die Gesamtbelastbarkeit. Dementsprechend wurde bereits gezeigt, dass in dünnen kompakten Knochen weniger Kanäle als in dicken kompakten Knochen vorlagen, da diese die sonst schon geringere mechanische Belastbarkeit dünner Knochen noch weiter herabsetzen würden. Bei diesen Kanälen des kompakten Knochens handelt es sich in den betreffenden Studien mutmaßlich um Blutgefäße^{69,71,161}. Somit könnten die beobachteten inhomogenen Gefäßverteilungen und Gefäßverläufe durch den kompakten Knochen einer homogenen Belastbarkeit des Knochens, abhängig von seiner Knochendicke, dienen.

4.3.4 Analyse der osseären Vaskularisation verschiedener Krankheitsmodelle

Es wurde bereits in früheren Studien beschrieben, dass im kompakten Knochen von murinen Röhrenknochen Kanäle vorliegen, bei denen es sich mutmaßlich um Blutgefäße handelt. Auch wurde bereits gezeigt, dass die Anzahl dieser Kanäle in analysierten Ausschnitten der Diaphyse abhängig von der Knochendicke verändert^{69,71,161}. Nachdem nun in dieser Doktorarbeit der geschlossene Blutkreislauf im murinen Röhrenknochen aufgeklärt und die Vaskularisation des kompakten Knochens detailliert analysiert wurde, wurden die Befunde der C57BL/6J Tibia mit verschiedenen osseären Krankheitsmodellen verglichen. Dabei konnte entsprechend der bereits erwähnten Studien bestätigt werden, dass bei einer Zunahme der Knochendicke, die hier anhand des SWAP70^{-/-} Osteopetrose-Modells untersucht wurde, eine hoch signifikante Zunahme der TKGs vorlag. Dabei zeigte sich auch, dass die Anzahl der dTKGs abnahm während der Anteil der komplexeren TKGs, wie den gTKGs und kTKGs stieg. Demnach lagen in dem dickeren Knochen nicht nur mehr Blutgefäße sondern auch ein komplexeres Gefäßnetzwerk vor. Diese Befunde könnten wie bereits beschrieben, auf die Nährstoffversorgung des kompakten Knochens und der beinhalteten Zellen, so wie der Generierung einer homogenen Knochenstabilität zurück zu führen sein.

Bei den Analysen des TNFtg-Mausmodells, einem etablierten Modell für Osteoporose, zeigten sich im Vergleich zu den osteopetrotischen SWAP70^{-/-} Tibiae gegenläufige Befunde. Bei der geringeren Knochendicke des Osteoporose-Modells lagen mit 1628 TKGs zu 2112 TKGs signifikant weniger Gefäße als in den gesunden Kontrolltibiae vor. Interessanterweise wiesen die TNFtg-Kontrolltiere, bei denen es sich um C57BL/6N-Littermates handelte, mit durchschnittlich 2112 TKGs wesentlich mehr Gefäße in der Tibia als die bisher analysierten C57BL/6J Tiere mit durchschnittlich

926 TKGs auf. Es wurde bereits beschrieben, dass sich C57BL/6J und C57BL/6N Mäuse genetisch in 11 verschiedenen Genloki unterscheiden, die in phänotypischen Unterschieden der Mauslinien resultieren können. So weisen C57BL/6N Mäuse eine signifikant höhere Pulsrate bei geringerem Herzgewicht als C57BL/6J Mäuse auf. Des Weiteren verfügen C57BL/6J Mäuse über einen vergleichsweise beeinträchtigten Glucose-Metabolismus, der mutmaßlich auf die C57BL/6J spezifische Depletion des *Nnt* Gens, das eine zentrale Rolle bei der Insulinproduktion der pankreatischen Betazellen spielt, zurückzuführen ist. Allerdings wurden keine osseären Unterschiede hinsichtlich der kortikalen Dicke, der kortikalen Porosität oder des trabekulären Knochenvolumens nachgewiesen^{162,163}. Da sich die kortikale Knochenporosität aus der vaskulären Porosität, der Lakunen-Kanalikuli-Porosität und der Kollagen-Apatit-Porosität zusammensetzt, wäre bei den hier vorliegenden Unterschieden bezüglich der Knochenvascularisation ein deutlicher Unterschied in diesen Studien zu erwarten gewesen^{52,161}. Da die im Rahmen dieser Doktorarbeit erstellten Quantifizierungen der C57BL/6J und C57BL/6N LSFM-Daten von zwei verschiedenen Personen unabhängig voneinander erhoben und überprüft wurden, ist ein entsprechender Auswertefehler auszuschließen. Dass dieser hoch signifikante Unterschied der Knochenvascularisation in den erwähnten Studien nicht ermittelt wurde, könnte daher auf die dort verwendeten Methoden zurück zu führen sein. So wurde die Analyse der Knochenporosität basierend auf μ CT-Aufnahmen des Femurs von 14 Wochen alten männlichen Tieren erstellt, wobei lediglich ein kleiner Ausschnitt der Diaphyse ausgewertet wurde¹⁶². Die Daten der entsprechenden Versuche dieser Doktorarbeit basieren jedoch auf der Analyse von LSFM-Aufnahmen von gesamten Tibiae weiblicher 8-12 Wochen alter Tiere, wobei allerdings nicht die Knochenporosität sondern lediglich die Vaskularisation analysiert wurde.

Folglich sollten bei weiteren Studien zur Knochenvascularisation die genetischen Hintergründe der Mauslinien berücksichtigt und das jeweilige osseäre Blutgefäßsystem unabhängig von dem eigentlichen Versuchsziel mit analysiert werden. Denn auch bei einem weiteren hier untersuchten osseären Krankheitsmodell zur rheumatoiden Arthritis traten von der C57BL/6J Maus abweichende Befunde bezüglich der TKG-Anzahl im kompakten Knochen auf.

Als Modell für eine induzierbare rheumatoide Arthritis wurden DBA/1 DREG Mäuse über einen Zeitraum von 62 Tagen analysiert. Während an Tag 14 der induzierten Arthritis die G6PI/CFA behandelten Tiere mit durchschnittlich 489 Gefäßen pro Tibia

dieselben TKG-Anzahlen wie die PBS/PBS- und die PBS/CFA-Kontrollgruppe aufwiesen, war eine signifikante Zunahme der TKGs mit fortschreitender Arthritis zu beobachten. So wiesen die G6PI/CFA-behandelten DBA/1 DEREK Mäuse an Tag 28 nach Induktion der Arthritis bereits um die 929 TKGs und an Tag 62 1207 TKGs pro Tibia auf. Somit hatte sich innerhalb dieses Zeitrahmens die Anzahl der kortikalen Gefäße nahezu verdreifacht. Allerdings war auch bei den Kontrollgruppen ein Anstieg der TKG-Zahlen über die Zeit zu beobachten. So wiesen die PBS/CFA behandelten Mäuse an Tag 28 durchschnittlich 715 TKGs pro Tibia und an Tag 62 887 TKGs pro Tibia auf, während die PBS/PBS behandelten Tiere lediglich 750 TKGs pro Tibia aufwiesen.

Die Zunahme der TKGs über die Zeit bei der CFA/PBS-behandelten Kontrollgruppe könnte auf das verabreichte CFA zurück zu führen sein. Dieses wirkt stimulierend auf das Immunsystem und könnte somit entsprechende Reaktionen auf die Depletion der FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen in diesem Modell verstärken ¹⁶⁴. Denn während in DBA/1 die alleinige Anwendung von CFA keine rheumatoide Arthritis induzieren kann, resultierte die einmalige intradermale Injektion von CFA bei IFN- γ R KO Mäusen in Symptomen einer rheumatoiden Arthritis, die sich ab Tag 16 nach der Injektion äußerten ¹⁶⁵. Des Weiteren wurde bereits beschrieben, dass IFN- γ die Konvertierung von CD4⁺CD25⁻ T-Zellen zu CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen (T_{regs}) initiiert, indem es zusammen mit TGF- β die Expression von FoxP3 in den CD4⁺CD25⁻ T-Zellen induziert ¹⁶⁶. Folglich könnte die genetische Ausschaltung des IFN- γ R in den IFN- γ R KO Mäusen zu einer Unterdrückung der T_{reg}-Differenzierung führen. Dies wiederum könnte die Befunde der ansteigenden TKG-Zahlen bei der PBS/CFA-Gruppe erklären. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden keine DBA/1 sondern DBA/1 DEREK Mäuse, deren T_{regs} mittels DTX depletiert wurden, verwendet. Sollte also die bereits beschriebene Arthritis-induzierbare Wirkung von CFA mit der Abwesenheit von T_{regs} assoziiert sein, könnte auch die alleinige Verwendung des CFAs in den DBA/1 DEREK eine rheumatoide Arthritis induziert haben, wobei das Krankheitsbild in der kombinierten Anwendung mit G6PI deutlich stärker ausgeprägt verläuft.

Darüber hinaus war es sehr überraschend, wie schnell sich das Gefäßsystem im kompakten Knochen unter Einfluss der rheumatoiden Arthritis veränderte. Insbesondere da sowohl die Angiogenese als auch der Knochenumbau zahlreiche komplexe und vielschritte Prozesse umfassen, ist diese Geschwindigkeit erstaunlich ¹⁶⁷. Zwar liegen bereits *in vivo* Methoden zur Untersuchung der Angiogenese, wie beispiels-

weise Analysen des Zebrafisches oder der Hornhaut-Mikrotest der Cornea, vor, entsprechende Studien zum Knochen scheinen aber bisher nicht durchgeführt worden zu sein ^{168,169}. Folglich wäre es interessant zu überprüfen, ob die Mechanismen und die kinetischen Parameter der Angiogenese im kompakten Knochen mit den Prozessen in weichem Gewebe vergleichbar sind und ob diese Prozesse über dieselben Faktoren in gleichem Umfang reguliert werden können. Insbesondere da im Knochen zusätzlich zu der Angiogenese ein Knochenumbau erfolgen muss, sollten hier jedoch komplexere Regulierungsmechanismen zu erwarten sein.

Obwohl bereits beschrieben wurde, dass die rheumatoide Arthritis mit einer verstärkten Angiogenese in dem synovialen Gewebe der entzündeten Gelenke assoziiert ist, hätten die für die rheumatoide Arthritis charakteristischen Knochenschädigungen eine Abnahme der Blutgefäße in den murinen Röhrenknochen erwarten lassen, um die Widerstandsfähigkeit des Knochens zu erhalten ^{167,170}. So spielt beispielsweise RANKL bei der Osteoklastendifferenzierung eine zentrale Rolle und beeinflusst somit Knochenabbauprozesse, die mit rheumatoider Arthritis assoziiert sind ²⁶. Darüber hinaus ist beschrieben worden, dass RANKL die VEGF-induzierte Angiogenese inhibieren kann ¹⁷¹. Die tatsächliche Zunahme der TKGs könnte allerdings auf Entzündungsparameter, die mit der rheumatoiden Arthritis assoziiert sind, zurück zu führen sein. So können Monozyten und Makrophagen, die in entzündetes Gewebe einwandern, durch die Sezernierung von proteolytischen Enzymen, reaktiven Sauerstoffspezies und Entzündungsmediatoren nicht nur die Entzündung bekämpfen sondern auch die Angiogenese stimulieren ¹⁷². Doch auch neutrophile Granulozyten und Eosinophile, die als erstes die entzündeten Areale infiltrieren, können diverse Faktoren sezernieren, die direkt oder indirekt die Angiogenese beeinflussen. Durch diese Faktoren, wie VEGF, bFGF, HGF, TGF- β oder TNF- α , oder anhand von Entzündungsmediatoren können sie Endothelzellen und Fibroblasten zur Produktion von angiogenen Faktoren anregen. Diese beschriebenen Faktoren beziehen sich allerdings alle auf die Prozesse der Angiogenese in dem entzündeten Synovialgewebe. Da die Angiogenese aber gewebeunabhängig denselben Mechanismen unterliegt, kann angenommen werden, dass auch die Angiogenese der TKGs in den arthritischen Knochen mit diesen Faktoren assoziiert ist ^{167,170}.

Es ist bereits vielfach beschrieben worden, dass die Knochenschädigungen, die mit der rheumatischen Arthritis assoziiert sind, in einer Osteoporose resultieren können ¹⁷³⁻¹⁷⁵. Interessanterweise zeigte sich in den hier erhobenen Untersuchungen aber

nicht wie bei dem analysierten Osteoporosemodell TNFtg eine Abnahme der TKGs sondern ein hoch signifikanter Anstieg der Blutgefäße im kompakten Röhrenknochen. Während bereits gezeigt wurde, dass die kortikale Knochenporosität bei geringerer Knochendichte mit einem Rückgang der vaskulären Kanäle einhergeht, scheinen derartig detaillierte Untersuchungen zur Knochenvascularisation bei der rheumatoiden Arthritis bisher nicht vorzuliegen^{69,71,176}. Die Zunahme der TKGs in Kombination mit der Abnahme der Knochendichte könnte daher das erhöhte Fraktur-Risiko bei Arthritis-assoziierten osteoporotischen Knochen erklären, da die hohe Anzahl der TKGs die mechanische Belastbarkeit des Knochens zusätzlich reduzieren kann¹⁷³⁻¹⁷⁵.

4.3.5 Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark in die generelle Blutzirkulation bei verschiedenen Krankheitsmodellen

Neben der reinen Struktur des osseären Blutgefäßsystems wurde auch die Funktionalität der neu identifizierten Gefäßstrukturen analysiert. Da die Mechanismen der Kurzzeit-Mobilisierung, die die Rekrutierung von Immunzellen aus dem Knochenmark in die generelle Blutzirkulation innerhalb weniger Stunden ermöglicht, noch nicht vollständig verstanden sind, wurde diese näher untersucht.

Dazu wurde die G-CSF-vermittelte Mobilisierung von neutrophilen Granulozyten in C57BL/6J und SWAP70^{-/-} Mäusen zwei und drei Stunden nach G-CSF Applikation analysiert. Dabei zeigte sich, dass die PBS-behandelten Kontrollgruppen beider Mauslinien mit 13-14 % neutrophilen Granulozyten in der Leukozytenpopulation etwa dasselbe Basallevel dieser Zellpopulation aufwiesen. Lediglich zwei Stunden nach der PBS-Applikation waren bei der SWAP70^{-/-} Linie zwei Mäuse mit sehr hohen neutrophilen Granulozyten-Werten zu beobachten, so dass das durchschnittliche Basallevel zu diesem Zeitpunkt etwas erhöht bei rund 16 % lag. Hier ist aber davon auszugehen, dass diese beiden Tiere Ausreißer darstellen, deren Basallevel eventuell stressbedingt erhöht gewesen sein könnten. Trotz dieser Ausreißer war sowohl zwei als auch drei Stunden nach G-CSF-Applikation ein signifikant größerer Anteil an neutrophilen Granulozyten in der Leukozytenpopulation der SWAP70^{-/-} Mäuse zu beobachten, als bei den C57BL/6 Kontrolltieren. Dabei stieg die neutrophilen Granulozyten-Population drei Stunden nach G-CSF Applikation sogar noch von 25 % auf 31 % an, während die Anzahl an neutrophilen Granulozyten bei den C57BL/6J Mäusen mit jeweils etwa 20 % konstant blieb.

Als Gegenmodell zu der Osteopetrose wurde auch die G-CSF vermittelte Mobilisierung von neutrophilen Granulozyten bei dem Osteoporosemodell TNFtg untersucht. Dabei ergaben sich wie bei dem SWAP70^{-/-} Mausmodell mit 9,6 % - 11,2 % relativ konstante Basallevel der neutrophilen Granulozyten für die TNFtg Mäuse und die C57BL/6N Littermate Kontrolltiere. Lediglich drei Stunden nach der PBS-Applikation zeigten die Littermate Kontrolltiere ein abgeschwächtes Basallevel von nur 5,4 % neutrophilen Granulozyten in der Leukozytenpopulation. Da die PBS-behandelte Kontrollgruppe zwei Stunden nach der Applikation eine recht hohe Heterogenität bezüglich ihrer jeweiligen Granulozyten-Zahlen aufwies, konnte aber nicht bestimmt werden, ob das Basallevel der Littermate Kontrolltiere grundsätzlich niedriger bei etwa 6 % oder höher bei 11 % lag. Dazu müssten weitere Messreihen mit mehr Versuchstieren durchgeführt werden.

Bei der G-CSF-vermittelten Mobilisierung der neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark in die generelle Blutzirkulation zeigten sich für alle Versuchsgruppen signifikante Rekrutierungen gegenüber den jeweiligen PBS-Kontrollgruppen. Während die C57BL/6N Littermate Kontrolltiere ihren Mobilisationspeak mit über 23 % zwei Stunden nach der G-CSF Applikation und einem anschließenden Rückgang auf 14,9 % drei Stunden nach der Applikation aufwiesen, blieb das Level der neutrophilen Granulozyten mit 17,9 % und 17,4 % bei den TNFtg Tieren konstant. Folglich lag hier im Gegensatz zu den SWAP70^{-/-} Mäusen keine länger andauernde Zell-Mobilisierung vor.

Diese gegenläufigen Ergebnisse der Zellmobilisierung in den beiden Mausmodellen korrelieren mit den Ergebnissen der TKG-Quantifizierungen. Während die SWAP70^{-/-} Mäuse signifikant mehr TKGs sowie eine stärkere und länger andauerndere G-CSF Mobilisierung der neutrophilen Granulozyten als ihre C57BL/6J Kontrolltiere aufweisen, verhielt sich die Neutrophilen-Mobilisierung bei den TNFtg Tieren genau umgekehrt. Diese verfügen über deutlich weniger TKGs als die C57BL/6N Littermate Kontrolltiere und weisen dabei eine konstant niedrigere Zellrekrutierung ohne erkennbaren zeitlichen Höchstpunkt auf. Da die übrigen Gefäße, die die generelle Blutzirkulation und das Knochenmark miteinander verbinden, in ihren Zahlen bei den verschiedenen Mausmodellen nicht schwankten, stellen die unterschiedlichen TKG-Zahlen die einzige Varianz des vaskulären Systems dar. Folglich könnte die Effektivität der Zellrekrutierung aus dem Knochenmark in die generelle Blutzirkulation mit der Anzahl von Gefäßen, die diese Systeme miteinander verbinden, assoziiert sein.

Allerdings ist fraglich, warum die SWAP70^{-/-} Linie eine grundsätzlich stärkere Mobilisierung auf den G-CSF-Stimulus zeigt als die Kontrolllinie. So wäre aufgrund der erhöhten TKG-Anzahl bei gleichem Basallevel zwar eine schnellere, aber insgesamt gleich starke Zellrekrutierung zu den Kontrolltieren zu erwarten gewesen. Die hier detektierte verstärkte Zellrekrutierung könnte durch die genetische Ausschaltung von SWAP70 bedingt sein. So ist bekannt, dass Rac1 und Rac2 für die Matrix-Adhäsion der neutrophilen Granulozyten notwendig sind und eine SWAP70-Defizienz einen negativen Effekt auf die Fibronectin-Adhäsion hat¹⁷⁷. Daher könnte die SWAP70-Defizienz in dem SWAP70^{-/-} Mausmodell eine schwächere Bindung der neutrophilen Granulozyten an die Knochenmarksmatrix bedingen, die bereits bei einem schwächeren Stimulus als bei den Kontrolltieren eine Loslösung der Zellen aus der Matrix und die Mobilisierung in die Blutzirkulation ermöglicht. Daher könnte das G-CSF trotz gleicher Basallevel bei gleicher Dosierung eine effizientere Mobilisierung bei dem SWAP70^{-/-} Mausmodell als bei den Kontrolltieren induzieren. Dieses Konzept müsste aber durch weitere Untersuchungen bestätigt oder falsifiziert werden.

Somit könnte auch erklärt werden warum trotz erhöhter Granulozyten-Werte zwei Stunden nach der G-CSF-Applikation auch zu dem später getesteten Zeitpunkt von drei Stunden noch ein weiterer Anstieg im Blut zu detektieren war. Da keine weiteren Zeitpunkte untersucht wurden ist unklar wie lange und wie stark die Mobilisierung bei diesem Mausmodell weiter verlaufen würde. Im Gegensatz dazu zeigte das TNFtg-Modell zwar eine schwache aber konstante Zellmobilisierung. Aufgrund der geringen TKG-Anzahl wäre eine verzögerte Rekrutierung denkbar, die eventuell länger aber dafür auf einem konstanten Level verläuft als bei den Kontrolltieren. Um dies zu überprüfen wären allerdings weitere durchflusszytometrische Messungen zu weiteren Zeitpunkten, die eine vollständige Kinetik der Zellmobilisierung und der Rückkehr zum Basallevel der jeweiligen Mauslinien umfassen, notwendig.

4.4 Die Vaskularisation humaner Röhrenknochen

Nachdem im Rahmen dieser Doktorarbeit der geschlossene Blutkreislauf im murinen Röhrenknochen aufgeklärt und strukturelle Unterschiede, die mit knochenverändernden Erkrankungen assoziiert sind, analysiert wurden, wurde abschließend das Blutgefäßsystem des humanen Röhrenknochens untersucht.

Fotographische Aufnahmen und Videoaufzeichnungen von verschiedenen Röhrenknochen, die im Zuge operativer Maßnahmen freigelegt wurden, zeigten zahlreiche Blutaustrittsstellen entlang des jeweiligen Knochenschaftes. Dabei handelt es sich mutmaßlich um den Blutaustritt aus dem Havers'schen Kanalsystem, welches bereits umfangreich für das humane System beschrieben wurde. Dabei werden longitudinal verlaufende Gefäße, die von konzentrischen Lamellen, den Osteon-Ringen, umgeben sind als Havers-Kanäle bezeichnet. Die Volkmann Kanäle hingegen verlaufen transvers zu den Havers-Kanälen, verbinden sich mit diesen und sind nicht von Osteon-Ringen umgeben^{2,30,67,68}. Die Havers-Kanäle können je nach Alter und Geschlecht einen Durchmesser von 50 µm bis 200 µm aufweisen, wohingegen zu den Volkmann Kanälen keine derartigen Analysen vorliegen^{9,43,158,178}.

Während das klassische Modell der Havers- und Volkmann-Kanäle eine strickleiterartige Vernetzung dieser beiden Kanalsysteme beschreibt, wurde mittels µCT-Aufnahmen gezeigt, dass diese Gefäße auch andere Formen der Verzweigungen im kompakten Knochen aufweisen können. So wurden laterale Verzweigungen, bei denen ein kleinerer Kanal von einem größeren Kanal abgeht, dichotome Verzweigungen, bei denen sich zwei gleich große Kanäle kreuzen, sowie der intraosteonale Umbau, bei dem ein junger neu gebildeter Kanal abschnittsweise in einem bereits bestehenden älteren Kanal verläuft und dann aus diesem austritt, identifiziert⁶⁷.

In der Literatur werden die Havers- und Volkmann-Kanäle als von Blutgefäßen und Nerven durchzogene Kanäle beschrieben. Interessanterweise liegen aber unterschiedliche Modelle vor. Demnach können die Kanäle von einem oder mehreren Gefäßen durchzogen sein oder auch noch zusätzlich Nervenfasern enthalten. Ob es sich bei den Gefäßen um Venen oder Arterien handelt wird in den entsprechenden Modellen nicht geklärt. Dabei lagen bis auf eine Quelle keine eindeutigen Abbildungen oder entsprechende Quellen, die die Blutgefäße und Nervenfasern in den Havers- und Volkmann-Kanälen nachweisen, vor^{2,4,6,9,30,51,52,60,62,65,67,178-180}. Bei besagter Quelle wurde anhand eines histologischen Schnittes eines humanen Fingerglieds gezeigt, dass das Havers'sche Kanalsystem blutgefüllt ist. Ob es sich bei den Gefäßen um Arterien oder Venen handelt und ob auch Nervenfasern durch diese Kanäle verlaufen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden⁶⁵. Andere Quellen, die das humane Blutgefäßsystem untersuchten, zeigten zwar ebenfalls blutgefüllte Poren im kompakten Knochen anhand histologischer Schnitte, diese stammten aber nicht von humanen Proben, sondern Mäusen, Ratten, Kaninchen, Hunden, Rindern, Meerkat-

zen oder Rhesus-Affen. Dabei ist zu beachten, dass Mäuse und auch junge Ratten zwar über Kanäle aber über keine Osteon-Struktur im kompakten Knochen verfügen^{6,180,181}. Einige Studien weisen aber auch gezielt darauf hin, dass es sich bei dem Havers'schen Kanalsystem mutmaßlich um ein Blutgefäßnetzwerk handelt, das in ihren Studien nicht direkt gezeigt werden kann^{66,72}. Insgesamt ermöglicht die unzureichende Aufklärung des Blutgefäßsystems im humanen Röhrenknochen jedoch keine genaue Bewertung der hier vorliegenden Bilder und Videos. Zwar ist ein Blutaustritt aus den Poren auf der Knochenoberfläche ersichtlich, es können aber keine Rückschlüsse auf Arterien oder Venen erhoben werden. Es ist lediglich ersichtlich, dass über das Havers'sche Kanalsystem nicht nur ein Bluteinstrom sondern auch ein Blutausstrom aus dem Knochen erfolgen kann.

Des Weiteren wurden 7T MRT-Aufnahmen des humanen Unterschenkels erstellt, die die Vaskularisation der Tibia und Fibula aufklären sollten. Hier konnte anhand von Kontrastunterschieden, die die distale oder proximale Flussrichtung des Blutes anzeigen, zwischen zwei verschiedenen Gefäßtypen in der Wadenmuskulatur unterschieden werden. Ein demnach mutmaßlich arterielles Gefäß trat in die Fibula ein und verlief longitudinal durch das Knochenmark. In der Tibia hingegen konnten zwei unterschiedliche Gefäße identifiziert werden, wobei es sich mutmaßlich um eine zentrale Arterie und den zentralen Hauptsinus, der sich im Knochenmark verzweigt, handelt. Die Identifikation dieser Gefäßstrukturen basiert jedoch lediglich auf der strukturellen Ähnlichkeit zu den identifizierten Gefäßen im murinen Röhrenknochen. Dementsprechend könnten die Verzweigungen des Hauptsinus im Knochenmark dem sinusoidalen Netzwerk des Knochenmarks zuzuordnen sein.

Trotz der sehr hohen 7T-Auflösung konnten jedoch keine Kanäle oder sogar Gefäße im kompakten Knochen detektiert werden. Folglich weisen die photographischen Aufnahmen und die 7T MRT-Aufnahmen zwar auf homologe Strukturen im humanen Röhrenknochen hin, eine genaue Aufklärung des Blutkreislaufs ist so aber nicht möglich. Die Applikation von Kontrastmitteln könnte zu stärkeren Signalen bei den MRT-Aufnahmen führen, die beispielsweise durch ihre Anflutung eine eindeutige Identifizierung von großen Arterien und Venen ermöglichen sollte. Die Anwendung einer höheren Feldstärke könnte ebenfalls die Signalintensität und optische Auflösung optimieren. So verfügt beispielsweise das Universitätsklinikum Jena über ein 9,5T Kleintier-MRT^{VI}. Zwar könnten hier keine Aufnahmen des Unterschenkels generiert werden, doch könnte beispielsweise die Vaskularisation in der menschlichen Hand

untersucht werden. Da anhand der murinen Knochen gezeigt wurde, dass die vaskulären Systeme in allen Röhrenknochen gleich aufgebaut sind, könnten die Untersuchungen humaner Fingerknochen entsprechende Rückschlüsse auf die Vaskularisation größerer humaner Knochen zulassen.

Abgesehen von *in vivo* Methoden wie den MRT Aufnahmen, wäre aber auch die LSFM eine denkbare Methode zur Aufklärung des Blutgefäßsystems im humanen Röhrenknochen. So könnten über Antikörperfärbungen, die mittels Inkubation der Proben in Antikörperlösungen (engl.: whole mount staining), verschiedene Gefäßstrukturen in humanen Proben angefärbt und identifiziert werden. Da die LSFM die Visualisierung von Proben bis zu einer Größe von etwa 2 cm ermöglicht, wären allerdings lediglich sehr kleine humane Knochen, wie das erste Fingerglied, der Phalanx distalis, für entsprechende Untersuchungen geeignet ⁹². Auch müssten die ethischen Aspekte der Untersuchung humaner Proben berücksichtigt werden.

5 Ausblick

5.1 Alterungsprozesse im Röhrenknochen

Die Nutzung der LSFM in Kombination mit dem im Rahmen dieser Doktorarbeit entwickelten Verfahren zu Optimierung der optischen Durchlässigkeit ermöglichte erstmals die Analyse des Blutgefäßsystems so wie die Aufklärung des geschlossenen Blutkreislaufs in ganzen murinen Röhrenknochen. Dabei wurde neben der Knochenmarksvaskularisation insbesondere die Vaskularisation des kompakten Knochens analysiert, die in bisherigen Studien nahezu keine Beachtung fand. Die dabei identifizierten Strukturen weisen große Ähnlichkeit zu dem Havers'schen Kanalsystem der humanen Röhrenknochen auf. Allerdings ist das entsprechende humane System ebenfalls kaum aufgeklärt. Folglich könnten weitere LSFM-basierte Studien, die beispielsweise kleine humane Knochen weitere Erkenntnisse zur Übertragbarkeit des murinen Gefäßsystems auf das humane System liefern.

Zwar verfügen Mäuse und Ratten im Gegensatz zum Menschen über keine Osteon-Strukturen im kompakten Knochen, es kann aber angenommen werden, dass die konzentrische Ausrichtung der Osteozyten um die Knochenkanäle herum keinen direkten Einfluss auf die Ausbildung oder den Verlauf der beinhalteten Gefäße hat. So wurden beispielsweise bereits zahlreiche Studien zur Knochenporosität durchgeführt, deren Befunde auf das humane System übertragen werden konnten ^{9,52,69,90,161,176,182,183}.

Hinsichtlich der im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten Analysen ist aber besonders bemerkenswert, dass sowohl Ratten als auch Menschen eine Zunahme der Kanäle im kompakten Knochen bei zunehmendem Alter aufweisen (Abbildung 39) ^{52,66,158,184,185}. Da bekannt ist, dass die Knochenalterung oftmals mit einer Abnahme der Knochendicke einhergeht, die sogar in einer Osteoporose resultieren kann, waren diese Befunde nicht zu erwarten ^{26,185}. So setzen die Blutgefäße im kompakten Knochen aufgrund ihres weichen Gewebes die Gesamtfestigkeit und somit die Widerstandsfähigkeit des Knochens gegenüber mechanischen Belastungen herab ^{52,71,176,182}. Als regulatorische Antwort des Systems auf den altersbedingten Knochenabbau wäre folglich eine Reduktion der Knochenkanäle zum Erhalt der Knochenstabilität zu erwarten gewesen. Diese Befunde entsprechen jedoch den Beobachtungen der Gefäßzunahmen im kompakten Knochen der DBA/1 DERE

Mäuse. Neben der Arthritis-induzierten Zunahme an TKGs wies auch die PBS/PBS-behandelten Kontrollgruppe eine Zunahme der Gefäße über die Zeit, also mit zunehmendem Alter, auf. Da bisher kaum Daten zur Vaskularisation im murinen Röhrenknochen vorlagen, liefert die LSFM in Kombination mit Endothelfärbungen nun die Möglichkeit die strukturellen Aspekte sowie die Mechanismen, die der Gefäßzunahme zugrunde liegen, in ganzen Organen unter Anwendung spezifischer fluoreszenter Marker zu untersuchen. Da beispielsweise die Stammzell-Aktivität bei zunehmendem Alter zurückgeht, wären Untersuchungen zu möglichen assoziierten Reduktionen

osseärer Populationen wie den Osteoblasten möglich ⁷⁶. Auch wären vergleichende Studien verschiedener Mauslinien interessant, da sich ihre jeweiligen TKG-Zahlen stark unterscheiden können. So wäre interessant, ob die TKGs ein generelles Maximum im Knochen erreichen können, welches mit der jeweiligen Knochengröße und –dicke assoziiert ist, oder ob die Knochenporosität unaufhörlich mit steigendem Alter zunimmt. Insgesamt würde die LSFM mit dem hier entwickelten Ethanol-ECi-Verfahren zur Optimierung der optischen Durchlässigkeit unter Anwendung von spezifischen fluoreszent-markierten Antikörpern erstmals die Analyse von strukturellen und funktionellen Aspekte der Knochenvaskularisation verschiedener Altersgruppen ermöglichen und könnte somit eventuelle Zusammenhänge mit Alterungsprozessen aufklären, die mit den bisher verfügbaren Methoden nicht nachweisbar waren.

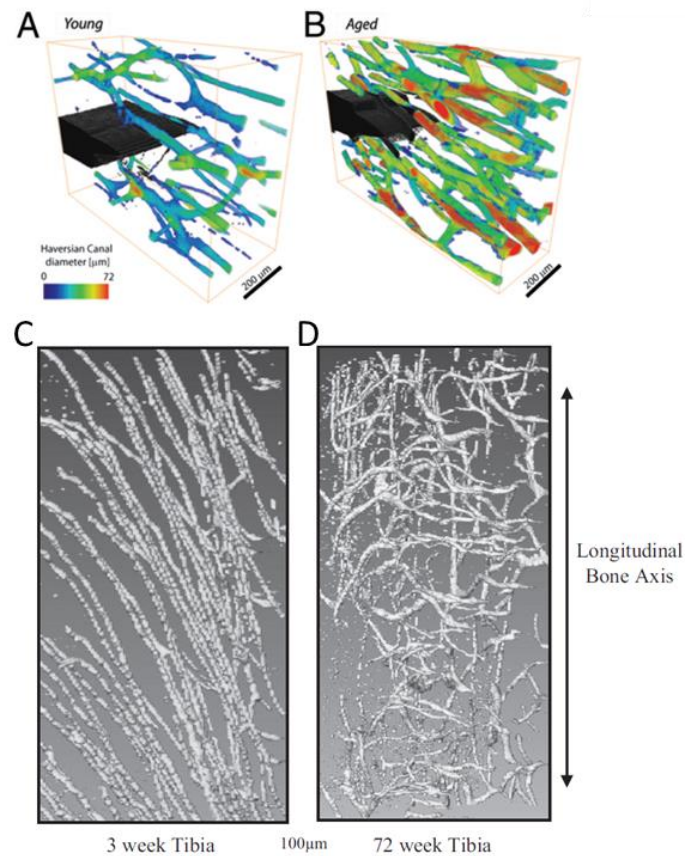


Abb. 39: μCT-Aufnahmen der kortikalen Kanäle mit zunehmendem Alter

μCT-Aufnahmen zeigen die Größe und Dicke des Havers'schen Kanalsystems in jungen (A) und alten (B) humanen Knochen (Farbkodierung entspricht dem Kanaldurchmesser). (C, D) Auch bei Ratten ist eine Zunahme der kortikalen Kanäle und eine deutlich komplexere Kanalanordnung mit steigendem Alter zu beobachten. ^{66,184}

5.2 Spornausbildung in der rheumatoiden Arthritis

Neben der Zunahme der TKGs bei der induzierten rheumatoiden Arthritis in den DBA/1 DEREK Mäusen war auch eine Ausbildung von Spornen an den distalen Enden der arthritischen Tibiae zu beobachten. Diese begannen sich bereits an Tag 28 der G6PI/CFA vermittelten Arthritis zu bilden und äußerten sich an Tag 62 in enormen Volumenvergrößerungen des kompakten Knochens. Anhand der LSM-Aufnahmen war ersichtlich, dass es sich bei diesen Volumenvergrößerungen um eine separate Knochenneubildung handelte, die auf dem bereits existenten kompakten Knochen aufbaute (Abbildung 40). Neben einer starken Vaskularisation, die diese Areale durch den kompakten Knochen hindurch mit dem ursprünglichen Knochenmark verband, war auch neues Gewebe in den Spornen zu erkennen, bei dem es sich mutmaßlich um neu gebildetes Knochenmark handelte. Ob es sich bei den Spornen selbst um Osteophyten, Sporne die sich am Gelenkrand ausbilden, oder Enthesophyten, Sporne die vom Ansatz einer Sehne, einer Faszie, eines Ligaments oder einer Gelenkkapsel ausgehen, handelt ist mit den hier vorliegenden Daten jedoch nicht eindeutig zu klären ^{186,187}.

Da Osteophyten aber eher laterale Knochenauswüchse an den Gelenken darstellen, während Enthesophyten bevorzugt in Zugrichtung der Sehnen oder Faszien wachsen, deutet die Spornausbildung der DBA/1 DEREK Mäuse, die sich entlang des Knochenschaftes erstreckt, eher auf eine Enthesophytenbildung hin. Darüber hinaus stellen Osteophyten ein typisches Merkmal der Arthrose dar und sind vermutlich mit der Gelenkinstabilität assoziiert, während Enthesophyten auch mit Entzündungen assoziiert sein können. So wurden Enthesophyten bei der seronegativen Spondylarthritis, oder der Enthesitis, der Entzündung der Sehnen-, Ligament-, oder Fasziensätze, beobachtet ¹⁸⁶⁻¹⁸⁸. Da diese Erkrankungen aber bisher primär mittel MRI oder Röntgenaufnahmen untersucht wurden, scheinen keine Studien die fluoreszenzbaasierte Verfahren zur Visualisierung der Knochenveränderungen vorzuliegen ^{189,190}.

Dementsprechend würde die LSM hier neue Möglichkeiten zur strukturellen und pathologischen Analyse der Enthesophytenbildung bei der rheumatoiden Arthritis ermöglichen. So könnten die Knochenumbauprozesse hinsichtlich ihres zeitlichen Verlaufs und der beteiligten Immunzellen genauer analysiert werden. Auch könnte der Effekt von Anti-Rheumatika auf diese Prozesse untersucht werden. So ist bekannt, dass das Synovium im Zuge der chronischen Entzündung während der rheumatoiden Arthritis einer starken Angiogenese unterliegt, weshalb diverse anti-

rheumatische Medikamente auch über anti-angiogene Eigenschaften verfügen⁴⁸.

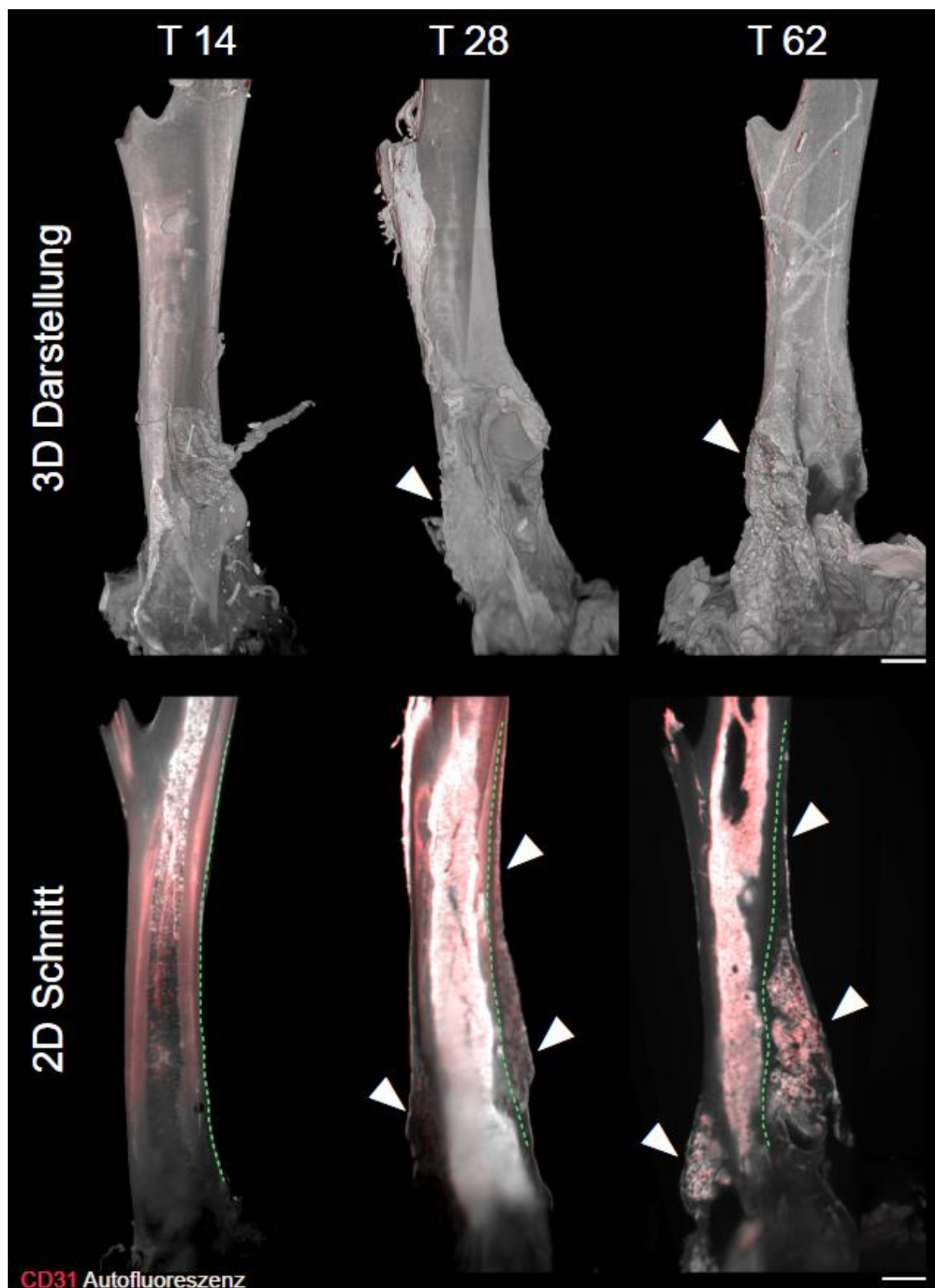


Abb. 40: Knochenumbauprozesse bei der G6PI/CFA induzierten Arthritis

Sowohl in der 3D Darstellung als auch in optischen 2D Schnitten lassen sich mittels LSM Neubildungen (weiße Pfeile) an den distalen Enden der G6PI/CFA-behandelten Tibiae an Tag 14 und 62 nach Behandlung beobachten. Bei diesen Strukturen handelt es sich mutmaßlich um Enthesophyten, das sie entlang des Knochenschaftes orientiert verlaufen. Des Weiteren sind sie klar von dem gesunden kompakten Knochen separiert (grüne gestrichelte Linie) und scheinen neues Knochenmark zu enthalten. Der Umfang dieser Knochenneubildungen nimmt mit fortschreitender Arthritis zu, wobei die knochenmarkähnlichen Strukturen den Großteil des Volumens ausfüllen. Größenbalken = 500 µm

So kann beispielsweise Cyclosporin A die Cyclo-Oxygenase-2 (Cox-2) vermittelte VEGF-induzierte Angiogenese inhibieren und auch die Blockade von TNF- α oder dem TNF-ähnlichen schwachen Apoptose-Induzierer (engl.: TNF-like weak inducer of apoptosis, TWEAK) führt zu einem einen Rückgang der synovialen Vaskulatur ¹⁶⁷. Mittels der LSFM könnten erstmals die Einflüsse dieser Medikamente auf die Gefäße im gesamten Synovium und auch eine potentielle Wirkung auf die Knochenumbau-prozesse analysiert werden.

Da die rheumatoide Arthritis neben der Angiogenese auch mit einer starken Infiltration verschiedenster Immunzellen in das Synovium assoziiert ist, könnten sowohl die LSFM als auch die intra-vitale TPLSM für weitere Studien dieser Prozesse genutzt werden. So könnten intra-vital die Migrationsprozesse in das Synovium und die Pathogenese untersucht werden.

Anhand der Inhibition von Immunzellen, beispielsweise mittels einer CXCR-2 Blockade von neutrophilen Granulozyten via eines anti-CXCR2-Serums, oder der Depletion von Immunzellen, wie beispielsweise B-Zellen oder auch CD4⁺ T-Helferzellen mittels Rituximab, könnten die Mechanismen dieser definierten Zellpopulationen bei der Entstehung und weiteren Entwicklung der rheumatoiden Arthritis sowohl bezüglich des Synoviums als auch des assoziierten Knochengewebes analysiert werden ^{74,191}. Da die LSFM ein *in situ* Verfahren darstellt, könnten dabei dieselben Tiere, die zuvor *in vivo* mittels der intra-vitalen TPLSM untersucht wurden genutzt werden. Somit könnten methodenübergreifende Untersuchungen, auch in Kombination mit weiteren Verfahren wie der Durchflusszytometrie, einen umfassenderen Einblick in die Krankheitsprozesse der rheumatoiden Arthritis sowohl hinsichtlich definierter Areale als auch gesamter Organe und Gewebe ermöglichen.

6 Literaturverzeichnis

- I Sigma–Aldrich,
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/supelco/442236?lang=de®ion=DE>, zitiert am 29.08.2016, Sicherheitsdatenblatt siehe Anhang
 - II Sigma–Aldrich,
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/b6630?lang=de®ion=DE>, zitiert am 29.08.2016, Sicherheitsdatenblatt siehe Anhang
 - III Sigma–Aldrich,
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/h1009?lang=de®ion=DE>, zitiert am 29.08.2016, Sicherheitsdatenblatt siehe Anhang
 - IV Sigma–Aldrich,
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/270997?lang=de®ion=DE>, zitiert am 29.08.2016, Sicherheitsdatenblatt siehe Anhang
 - V Sigma–Aldrich,
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/176125?lang=de®ion=DE>, zitiert am 29.08.2016, Sicherheitsdatenblatt siehe Anhang
 - VI Institut für diagnostische und interventionelle Radiologie, Universitätsklinikum Jena, <http://www.mrt.uni-jena.de/MR-Kleintierbildgebung.236.0.html>, zitiert am 29.09.2016
-
- 1 Bradley, E. W., McGee-Lawrence, M. E. & Westendorf, J. J. Hdac-Mediated Control of Endochondral and Intramembranous Ossification. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*. 21, 101-113 (2011).
 - 2 Saladin, K. S. *Human Anatomy*. 2 edn, 1-849 (Michelle Watnick, 2008).
 - 3 McKee, M. D. & Cole, W. G. *Bone Matrix and Mineralization*. 2 edn, (Elsevier, 2012).
 - 4 Genina, E. A., Bashkatov, A. N. & Tuchin, V. V. Optical Clearing of Cranial Bone. *Advances in Optical Technologies* 2008, 1-8, doi:10.1155/2008/267867 (2008).
 - 5 Clarke, B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol* 3 Suppl 3, S131-139, doi:10.2215/CJN.04151206 (2008).
 - 6 Hamed, E. *et al.* Elastic moduli of untreated, demineralized and deproteinized cortical bone: validation of a theoretical model of bone as an interpenetrating composite material. *Acta Biomater* 8, 1080-1092, doi:10.1016/j.actbio.2011.11.010 (2012).
 - 7 Inzana, J. A. *et al.* Bone fragility beyond strength and mineral density: Raman spectroscopy predicts femoral fracture toughness in a murine model of rheumatoid arthritis. *J Biomech* 46, 723-730, doi:10.1016/j.jbiomech.2012.11.039 (2013).
 - 8 Tolar, J., Teitelbaum, S. L. & Orchard, P. J. mechanisms of disease Osteopetrosis. *The new england journal of medicine* 351, 2839-2849 (2004).

- 9 Kuhnisch, J. *et al.* Multiscale, converging defects of macro-porosity, microstructure and matrix mineralization impact long bone fragility in NF1. *PLoS One* 9, e86115, doi:10.1371/journal.pone.0086115 (2014).
- 10 Sommerfeldt, D. W. & Rubin, C. T. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur Spine J* 10 Suppl 2, S86-95, doi:10.1007/s005860100283 (2001).
- 11 Olsen, B. R. *Morphogenesis, Structure & Cell Biology of Bone*. (American Society for Bone and Mineral Research, 2006).
- 12 J. A. BUCKWALTER, M. J. G., R. R. COOPER and R. RECKER. Bone Biology. *J Bone Joint Surg Am.* 77, 1276-1289 (1995).
- 13 Florencio-Silva, R., Sasso, G. R., Sasso-Cerri, E., Simoes, M. J. & Cerri, P. S. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int* 2015, 421746, doi:10.1155/2015/421746 (2015).
- 14 Rahman, M. S., Akhtar, N., Jamil, H. M., Banik, R. S. & Asaduzzaman, S. M. TGF-beta/BMP signaling and other molecular events: regulation of osteoblastogenesis and bone formation. *Bone Res* 3, 15005, doi:10.1038/boneres.2015.5 (2015).
- 15 Xu, J., Li, Z., Hou, Y. & Fang, W. Potential mechanisms underlying the Runx2 induced osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells. *Am J Transl Res* 7, 2527-2535 (2015).
- 16 Ramasamy, S. K., Kusumbe, A. P., Wang, L. & Adams, R. H. Endothelial Notch activity promotes angiogenesis and osteogenesis in bone. *Nature* 507, 376-380, doi:10.1038/nature13146 (2014).
- 17 Zhang, Y., Khan, D., Delling, J. & Tobiasch, E. Mechanisms underlying the osteo- and adipo-differentiation of human mesenchymal stem cells. *ScientificWorldJournal* 2012, 793823, doi:10.1100/2012/793823 (2012).
- 18 Logothetis, C. J. & Lin, S.-H. Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone. *Nat Rev Cancer* 5, 21-28 (2005).
- 19 Lin, G. L. & Hankenson, K. D. Integration of BMP, Wnt, and notch signaling pathways in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem* 112, 3491-3501, doi:10.1002/jcb.23287 (2011).
- 20 Dallas, S. L. & Bonewald, L. F. Dynamics of the transition from osteoblast to osteocyte. *Ann N Y Acad Sci* 1192, 437-443, doi:10.1111/j.1749-6632.2009.05246.x (2010).
- 21 Bonewald, L. The holy grail of high bone mass. *Nat Med* 17, 657-658, doi:10.1038/nm0611-657 (2011).
- 22 Lu, Y. *et al.* The biological function of DMP-1 in osteocyte maturation is mediated by its 57-kDa c-terminal fragment. *Journal of Bone and Mineral Research* 26, 331-340, doi:10.1002/jbmr.226 (2011).
- 23 St John, H. C. *et al.* The osteoblast to osteocyte transition: epigenetic changes and response to the vitamin D3 hormone. *Mol Endocrinol* 28, 1150-1165, doi:10.1210/me.2014-1091 (2014).
- 24 Feng, J. Q., Clinkenbeard, E. L., Yuan, B., White, K. E. & Drezner, M. K. Osteocyte regulation of phosphate homeostasis and bone mineralization

- underlies the pathophysiology of the heritable disorders of rickets and osteomalacia. *Bone* 54, 213-221, doi:10.1016/j.bone.2013.01.046 (2013).
- 25 Liebich, H.-G. *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere - Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis*. Vol. 4 1-385 (Schattauer, 20047).
- 26 Arboleya, L. & Castañeda, S. Osteoimmunology: The Study of the Relationship Between the Immune System and Bone Tissue. *Reumatologia Clinica* 9, 303-315 (2014).
- 27 Crane, J. L. & Cao, X. Bone marrow mesenchymal stem cells and TGF-beta signaling in bone remodeling. *J Clin Invest* 124, 466-472, doi:10.1172/JCI70050 (2014).
- 28 Cao, X. Targeting osteoclast-osteoblast communication. *Nat Med* 17, 1344-1346, doi:10.1038/nm.2499 (2011).
- 29 Nanjundaiah, S. M., Astry, B. & Moudgil, K. D. Mediators of inflammation-induced bone damage in arthritis and their control by herbal products. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013, 518094, doi:10.1155/2013/518094 (2013).
- 30 J. E. Fonseca *et al.* *Bone: a story of breakthroughs, a promising future*. Vol. 34 1-131 (Servier, 2012).
- 31 Lee, N. K. Molecular Understanding of Osteoclast Differentiation and Physiology. *Endocrinology and Metabolism* 25, 264, doi:10.3803/EnM.2010.25.4.264 (2010).
- 32 Roscher, A. *et al.* The F-actin modulator SWAP-70 controls podosome patterning in osteoclasts. *Bone Reports*, doi:10.1016/j.bonr.2016.07.002 (2016).
- 33 Garbe, A. I. *et al.* Regulation of bone mass and osteoclast function depend on the F-actin modulator SWAP-70. *J Bone Miner Res* 27, 2085-2096, doi:10.1002/jbmr.1670 (2012).
- 34 Shinohara, M. *et al.* SWAP-70 is a guanine-nucleotide-exchange factor that mediates signalling of membrane ruffling. *Nature* 416, 759-763, doi:10.1038/416759a (2002).
- 35 Huveneers, S. & Danen, E. H. J. Adhesion signaling – crosstalk between integrins, Src and Rho. *Journal of Cell Science* 122, 1059-1069, doi:10.1242/jcs.039446 (2009).
- 36 Zaidi, M. Skeletal remodeling in health and disease. *Nat Med* 13, 791-801, doi:10.1038/nm1593 (2007).
- 37 Paloneva, J. *et al.* DAP12/TREM2 deficiency results in impaired osteoclast differentiation and osteoporotic features. *J Exp Med* 198, 669-675, doi:10.1084/jem.20030027 (2003).
- 38 Usami, Y., Gunawardena, A. T., Iwamoto, M. & Enomoto-Iwamoto, M. Wnt signaling in cartilage development and diseases: lessons from animal studies. *Lab Invest* 96, 186-196, doi:10.1038/labinvest.2015.142 (2016).
- 39 Medici, M. *et al.* BMP-2 gene polymorphisms and osteoporosis: the Rotterdam Study. *J Bone Miner Res* 21, 845-854, doi:10.1359/jbmr.060306 (2006).

-
- 40 Lacativa, P. G. S. & Fleiuss de Farias, M. L. Osteoporosis and inflammation. *Arq Bras Endocrinol Metab* 54, 123-132 (2010).
- 41 Ivashkiv, L. B. Cross-regulation of signaling by ITAM-associated receptors. *Nat Immunol* 10, 340-347, doi:10.1038/ni.1706 (2009).
- 42 Soltanoff, C. S., Chen, W., Yang, S. & Y-P., L. Signaling Networks that Control the Lineage Commitment and Differentiation of Bone Cells. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 19, 1-46 (2009).
- 43 Alma, Y., Valds-Flores, M., Orozco, L. & Velzquez-Cruz, R. Molecular Aspects of Bone Remodeling. doi:10.5772/54905 (2013).
- 44 Zhong, Z., Ethen, N. J. & Williams, B. O. WNT signaling in bone development and homeostasis. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 3, 489-500, doi:10.1002/wdev.159 (2014).
- 45 Dwek, J. R. The periosteum: what is it, where is it, and what mimics it in its absence? *Skeletal Radiol* 39, 319-323, doi:10.1007/s00256-009-0849-9 (2010).
- 46 Ortega, N., Behonick, D. J. & Werb, Z. Matrix remodeling during endochondral ossification. *Trends in Cell Biology* 14, 86-93, doi:10.1016/j.tcb.2003.12.003 (2004).
- 47 Sivaraj, K. K. & Adams, R. H. Blood vessel formation and function in bone. *Development* 143, 2706-2715, doi:10.1242/dev.136861 (2016).
- 48 Clapp, C., Thebault, S., Jeziorski, M. C. & Martinez De La Escalera, G. Peptide hormone regulation of angiogenesis. *Physiol Rev* 89, 1177-1215, doi:10.1152/physrev.00024.2009 (2009).
- 49 Diehl, S. *et al.* Altered expression patterns of EphrinB2 and EphB2 in human umbilical vessels and congenital venous malformations. *Pediatr Res* 57, 537-544, doi:10.1203/01.PDR.0000155761.70710.C4 (2005).
- 50 Saharinen, P. & Alitalo, K. The yin, the yang, and the angiopoietin-1. *J Clin Invest* 121, 2157-2159, doi:10.1172/JCI58196 (2011).
- 51 Sims, N. A. & Martin, T. J. Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. *Bonekey Rep* 3, 481, doi:10.1038/bonekey.2013.215 (2014).
- 52 Cardoso, L., Fritton, S. P., Gailani, G., Benalla, M. & Cowin, S. C. Advances in assessment of bone porosity, permeability and interstitial fluid flow. *J Biomech* 46, 253-265, doi:10.1016/j.jbiomech.2012.10.025 (2013).
- 53 He, X. *et al.* BMP2 genetically engineered MSCs and EPCs promote vascularized bone regeneration in rat critical-sized calvarial bone defects. *PLoS One* 8, e60473, doi:10.1371/journal.pone.0060473 (2013).
- 54 Li, X. M., Hu, Z., Jorgenson, M. L., Wingard, J. R. & Slayton, W. B. Bone marrow sinusoidal endothelial cells undergo nonapoptotic cell death and are replaced by proliferating sinusoidal cells in situ to maintain the vascular niche following lethal irradiation. *Exp Hematol* 36, 1143-1156, doi:10.1016/j.exphem.2008.06.009 (2008).
- 55 Murfee, W. L., Skalak, T. C. & Peirce, S. M. Differential arterial/venous expression of NG2 proteoglycan in perivascular cells along microvessels:
-

- identifying a venule-specific phenotype. *Microcirculation* 12, 151-160, doi:10.1080/10739680590904955 (2005).
- 56 Kusumbe, A. P., Ramasamy, S. K. & Adams, R. H. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone. *Nature* 507, 323-328, doi:10.1038/nature13145 (2014).
- 57 Morrison, S. J. & Scadden, D. T. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* 505, 327-334, doi:10.1038/nature12984 (2014).
- 58 Hammer, N. *et al.* Comparison of the Fluid Resuscitation Rate with and without External Pressure Using Two Intraosseous Infusion Systems for Adult Emergencies, the CITRIN (Comparison of InTRAosseous infusion systems in emergency medicINe)-Study. *PLoS One* 10, e0143726, doi:10.1371/journal.pone.0143726 (2015).
- 59 Nagasawa, T. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nat Rev Immunol* 6, 107-116, doi:10.1038/nri1780 (2006).
- 60 Pazzaglia, U. E., Bonaspetti, G., Ranchetti, F. & Bettinsoli, P. A model of the intracortical vascular system of long bones and of its organization: an experimental study in rabbit femur and tibia. *Journal of Anatomy* 213, 183-193, doi:10.1111/j.1469-7580.2008.00932.x (2008).
- 61 Tomlinson, R. E. & Silva, M. J. Skeletal Blood Flow in Bone Repair and Maintenance. *Bone Res* 1, 311-322, doi:10.4248/BR201304002 (2013).
- 62 Travlos, G. S. Normal structure, function, and histology of the bone marrow. *Toxicol Pathol* 34, 548-565, doi:10.1080/01926230600939856 (2006).
- 63 Wideman, R. F. & Prisby, R. D. Bone circulatory disturbances in the development of spontaneous bacterial chondronecrosis with osteomyelitis: a translational model for the pathogenesis of femoral head necrosis. *Front Endocrinol (Lausanne)* 3, 183, doi:10.3389/fendo.2012.00183 (2012).
- 64 Kierszenbaum, A. L. & Tres, L. *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology*. 4 edn, 1-733 (ELSEVIER, 2016).
- 65 Marenzana, M. & Arnett, T. R. The Key Role of the Blood Supply to Bone. *Bone Research* 1, 203-215, doi:10.4248/br201303001 (2013).
- 66 Jast, J. & Jasiuk, I. Age-related changes in the 3D hierarchical structure of rat tibia cortical bone characterized by high-resolution micro-CT. *J Appl Physiol* (1985) 114, 923-933, doi:10.1152/japplphysiol.00948.2011 (2013).
- 67 Maggiano, I. S. *et al.* Three-dimensional reconstruction of Haversian systems in human cortical bone using synchrotron radiation-based micro-CT: morphology and quantification of branching and transverse connections across age. *J Anat* 228, 719-732, doi:10.1111/joa.12430 (2016).
- 68 Pazzaglia, U. E., Congiu, T., Raspanti, M., Ranchetti, F. & Quacci, D. Anatomy of the intracortical canal system: scanning electron microscopy study in rabbit femur. *Clin Orthop Relat Res* 467, 2446-2456, doi:10.1007/s11999-009-0806-x (2009).

-
- 69 Schneider, P. *et al.* Ultrastructural properties in cortical bone vary greatly in two inbred strains of mice as assessed by synchrotron light based micro- and nano-CT. *J Bone Miner Res* 22, 1557-1570, doi:10.1359/jbmr.070703 (2007).
- 70 Schneider, P. *et al.* Simultaneous 3D visualization and quantification of murine bone and bone vasculature using micro-computed tomography and vascular replica. *Microsc Res Tech* 72, 690-701, doi:10.1002/jemt.20720 (2009).
- 71 Schneider, P., Voide, R., Stampanoni, M., Donahue, L. R. & Muller, R. The importance of the intracortical canal network for murine bone mechanics. *Bone* 53, 120-128, doi:10.1016/j.bone.2012.11.024 (2013).
- 72 Kim, J. N. *et al.* Haversian system of compact bone and comparison between endosteal and periosteal sides using three-dimensional reconstruction in rat. *Anat Cell Biol* 48, 258-261, doi:10.5115/acb.2015.48.4.258 (2015).
- 73 Bianco, P. Bone and the hematopoietic niche: a tale of two stem cells. *Blood* 117, 5281-5288, doi:10.1182/blood-2011-01315069 (2011).
- 74 Kohler, A. *et al.* G-CSF-mediated thrombopoietin release triggers neutrophil motility and mobilization from bone marrow via induction of Cxcr2 ligands. *Blood* 117, 4349-4357, doi:10.1182/blood-2010-09-308387 (2011).
- 75 Kiel, M. J. & Morrison, S. J. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol* 8, 290-301, doi:10.1038/nri2279 (2008).
- 76 Köhler, A. *et al.* Altered cellular dynamics and endosteal location of aged early hematopoietic progenitor cells revealed by time-lapse intravital imaging in long bones. *Blood* 114, 290-298, doi:10.1182/blood-2008-12195644 (2009).
- 77 Kolaczowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol* 13, 159-175, doi:10.1038/nri3399 (2013).
- 78 Borregaard, N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity* 33, 657-670, doi:10.1016/j.immuni.2010.11.011 (2010).
- 79 Devi, S. *et al.* Neutrophil mobilization via plerixafor-mediated CXCR4 inhibition arises from lung demargination and blockade of neutrophil homing to the bone marrow. *J Exp Med* 210, 2321-2336, doi:10.1084/jem.20130056 (2013).
- 80 Furze, R. C. & Rankin, S. M. Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology* 125, 281-288, doi:10.1111/j.1365-2567.2008.02950.x (2008).
- 81 Yipp, B. G. & Kubes, P. Antibodies against neutrophil LY6G do not inhibit leukocyte recruitment in mice in vivo. *Blood* 121, 241-242, doi:10.1182/blood-2012-09-454348 (2013).
- 82 Von Hoff, D. D., Kuhn, J. G., Burris, H. A., 3rd & Miller, L. J. Does intraosseous equal intravenous? A pharmacokinetic study. *Am J Emerg Med* 26, 31-38, doi:10.1016/j.ajem.2007.03.024 (2008).
- 83 Huang, H. *et al.* G-CSF Administration after the Intraosseous Infusion of Hypertonic Hydroxyethyl Starches Accelerating Wound Healing Combined with Hemorrhagic Shock. *Biomed Res Int* 2016, 5317630, doi:10.1155/2016/5317630 (2016).
-

-
- 84 Schett, G. & Firestein, G. S. Mr Outside and Mr Inside: classic and alternative views on the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 69, 787-789, doi:10.1136/ard.2009.121657 (2010).
- 85 Jeon, T. Analysis of microstructure in mouse femur and decalcification effect on microstructure by electron microscopy. *Journal of Analytical Science and Technology* 1, 124-129, doi:10.5355/jast.2010.124 (2010).
- 86 Kaup, M. *et al.* Dual-Energy CT-based Display of Bone Marrow Edema in Osteoporotic Vertebral Compression Fractures: Impact on Diagnostic Accuracy of Radiologists with Varying Levels of Experience in Correlation to MR Imaging. *Radiology* 208, 510-519, doi:10.1148/radiol.2016150472 (2016).
- 87 Acar, M. *et al.* Deep imaging of bone marrow shows non-dividing stem cells are mainly perisinusoidal. *Nature* 526, 126-130, doi:10.1038/nature15250 (2015).
- 88 Irmiler, I. M. *et al.* 18 F-Fluoride positron emission tomography/computed tomography for noninvasive in vivo quantification of pathophysiological bone metabolism in experimental murine arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 16, 1-9 (2014).
- 89 Roche, B. *et al.* Structure and quantification of microvascularisation within mouse long bones: what and how should we measure? *Bone* 50, 390-399, doi:10.1016/j.bone.2011.09.051 (2012).
- 90 Turner, P. J. *et al.* Osteopontin deficiency increases bone fragility but preserves bone mass. *Bone* 46, 1564-1573, doi:10.1016/j.bone.2010.02.014 (2010).
- 91 Hayward, L. N. *et al.* MRT letter: Contrast-enhanced computed tomographic imaging of soft callus formation in fracture healing. *Microsc Res Tech* 75, 7-14, doi:10.1002/jemt.21100 (2012).
- 92 Becker, K., Jahrling, N., Kramer, E. R., Schnorrer, F. & Dodt, H. U. Ultramicroscopy: 3D reconstruction of large microscopical specimens. *J Biophotonics* 1, 36-42, doi:10.1002/jbio.200710011 (2008).
- 93 Jährling N., B. K. a. D. H.-U. 3D-reconstruction of blood vessels by ultramicroscopy. *Organogenesis* 5, 227-230 (2009).
- 94 Dodt, H. U. *et al.* Ultramicroscopy: three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. *Nat Methods* 4, 331-336, doi:10.1038/nmeth1036 (2007).
- 95 Richardson, D. S. & Lichtman, J. W. Clarifying Tissue Clearing. *Cell* 162, 246-257, doi:10.1016/j.cell.2015.06.067 (2015).
- 96 Takaku, T. *et al.* Hematopoiesis in 3 dimensions: human and murine bone marrow architecture visualized by confocal microscopy. *Blood* 116, e41-55, doi:10.1182/blood-2010-02-268466 (2010).
- 97 Chen, J. Y. *et al.* Hoxb5 marks long-term haematopoietic stem cells and reveals a homogenous perivascular niche. *Nature* 530, 223-227, doi:10.1038/nature16943 (2016).
- 98 Erturk, A. *et al.* Three-dimensional imaging of solvent-cleared organs using 3DISCO. *Nat Protoc* 7, 1983-1995, doi:10.1038/nprot.2012.119 (2012).
-

-
- 99 Hama, H., Kurokawa, H., Kawano, H., Ando, R., Shimogori, T., Noda, H., Fukami, K., Sakaue-Sawano, A., Miyawaki, A. Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nat Neurosci* 14, 1481-1488, doi:10.1038/nn.2928 (2011).
- 100 Becker, K., Jähring, N., Saghafi, S., Weiler, R. & Dodt, H. U. Chemical clearing and dehydration of GFP expressing mouse brains. *PLoS One* 7, e33916, doi:10.1371/journal.pone.0033916 (2012).
- 101 Ke, M. T., Fujimoto, S. & Imai, T. SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nat Neurosci* 16, 1154-1161, doi:10.1038/nn.3447 (2013).
- 102 Schwarz, M. K., Scherbarth, A., Sprengel, R., Engelhardt, J., Theer, P., Giese, G. Fluorescent-protein stabilization and high-resolution imaging of cleared, intact mouse brains. *PLoS One* 10, e0124650, doi:10.1371/journal.pone.0124650 (2015).
- 103 Susaki E. A., T. K., Perrin D., Kishino F., Tawara T., Watanabe T. M., Yokoyama C., Onoe H., Eguchi M., Yamaguchi S., Abe T., Kiyonari H., Shimizu Y., Miyawaki A., Yokota H., Ueda H. R. Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. *Cell* 157, 726-739, doi:10.1016/j.cell.2014.03.042 (2014).
- 104 Yang, B. *et al.* Single-cell phenotyping within transparent intact tissue through whole-body clearing. *Cell* 158, 945-958, doi:10.1016/j.cell.2014.07.017 (2014).
- 105 Chan, C. K. *et al.* Endochondral ossification is required for haematopoietic stem-cell niche formation. *Nature* 457, 490-494, doi:10.1038/nature07547 (2009).
- 106 Lassailly, F., Foster, K., Lopez-Onieva, L., Currie, E. & Bonnet, D. Multimodal imaging reveals structural and functional heterogeneity in different bone marrow compartments: functional implications on hematopoietic stem cells. *Blood* 122, 1730-1740, doi:10.1182/blood-2012-11-467498 (2013).
- 107 Klingberg, A. *et al.* Fully Automated Evaluation of Total Glomerular Number and Capillary Tuft Size in Nephritic Kidneys Using Lightsheet Microscopy. *Journal of the American Society of Nephrology* 28, doi:10.1681/ASN.2016020232 (2016).
- 108 Klingberg, A. Non-hazardous optical clearing of biological samples. Germany patent 15197257.7 (2016).
- 109 Spatelholz, W. Über das Durchsichtigmachen von menschlichen und tierischen Präparaten. *Leipzig : Hirzel*, 9-48 (1911).
- 110 STEFFEN JUNG *et al.* Analysis of Fractalkine Receptor CX3CR1 Function by Targeted Deletion and Green Fluorescent Protein Reporter Gene Insertion. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* 20, 4106-4114, doi:10.1128/MCB.20.11.4106-4114.2000 (2000).
- 111 Hasenberg, A. *et al.* Catchup: a mouse model for imaging-based tracking and modulation of neutrophil granulocytes. *Nat Methods* 12, 445-452, doi:10.1038/nmeth.3322 (2015).
- 112 Lindquist, R. L. *et al.* Visualizing dendritic cell networks in vivo. *Nat Immunol* 5, 1243-1250, doi:10.1038/ni1139 (2004).
-

-
- 113 Campbell, T. N. & Choy, F. Y. M. The Effect of pH on Green Fluorescent Protein: a Brief Review. *Molecular Biology Today* 2, 1-4 (2001).
- 114 Shaner, N. C., Steinbach, P. A. & Tsien, R. Y. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* 2, 905-909, doi:10.1038/nmeth819 (2005).
- 115 Vielreicher, M. *et al.* Taking a deep look: modern microscopy technologies to optimize the design and functionality of biocompatible scaffolds for tissue engineering in regenerative medicine. *J R Soc Interface* 10, 20130263, doi:10.1098/rsif.2013.0263 (2013).
- 116 Tanaka, K. *et al.* Intravital imaging of gastrointestinal diseases in preclinical models using two-photon laser scanning microscopy. *Surg Today* 43, 123-129, doi:10.1007/s00595-012-0283-9 (2013).
- 117 Megens, R. T., Bianchini, M., Schmitt, M. M. & Weber, C. Optical imaging innovations for atherosclerosis research: multiphoton microscopy and optical nanoscopy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 35, 1339-1346, doi:10.1161/ATVBAHA.115.304875 (2015).
- 118 Phan, T. G. & Bullen, A. Practical intravital two-photon microscopy for immunological research: faster, brighter, deeper. *Immunol Cell Biol* 88, 438-444, doi:10.1038/icb.2009.116 (2010).
- 119 Ang, C. *et al.* Anti-glomerular basement membrane (GBM)-antibody-mediated disease with normal renal function. *Nephrol Dial Transplant* 13, 935-939 (1998).
- 120 Stelloh, C. *et al.* Prematurity in mice leads to reduction in nephron number, hypertension, and proteinuria. *Transl Res* 159, 80-89, doi:10.1016/j.trsl.2011.10.004 (2012).
- 121 Hochheiser, K. *et al.* Kidney Dendritic Cells Become Pathogenic during Crescentic Glomerulonephritis with Proteinuria. *J Am Soc Nephrol* 22, 306-316, doi:10.1681/ASN.2010050548 (2011).
- 122 Kunisaki, Y. *et al.* Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature* 502, 637-643, doi:10.1038/nature12612 (2013).
- 123 Faust N., Varas F., Kelly L. M., Heck S. & T., G. Insertion of enhanced green fluorescent protein into the lysozyme gene creates mice with green fluorescent granulocytes and macrophages. *Blood* 96, 719-726 (2000).
- 124 Herrak, P. *et al.* Zoledronic acid protects against local and systemic bone loss in tumor necrosis factor-mediated arthritis. *Arthritis Rheum* 50, 2327-2337, doi:10.1002/art.20384 (2004).
- 125 Jeanne Keffer, L. P., Haris Caziaris, Spiros Georgopoulos, Evangelos Kaslaris, Dimitris Kioussis and George Kollias. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *The EMBO Journal* 10, 4025-4031 (1991).
- 126 Frey, O., Bruns, L., Morawietz, L., Dunussi-Joannopoulos, K. & Kamradt, T. B cell depletion reduces the number of autoreactive T helper cells and prevents glucose-6-phosphate isomerase-induced arthritis. *PLoS One* 6, e24718, doi:10.1371/journal.pone.0024718 (2011).
- 127 Win, S. J., Kuhl, A. A., Sparwasser, T., Hunig, T. & Kamradt, T. In vivo activation of Treg cells with a CD28 superagonist prevents and ameliorates
-

- chronic destructive arthritis in mice. *Eur J Immunol* 46, 1193-1202, doi:10.1002/eji.201546104 (2016).
- 128 Buchwald, J. Z. Scientific Credibility and Technical Standards in 19th and early 20th century Germany and Britain. *Archimedes* 1996, 1-192, doi:10.1007/978-94-009-1784-2 (1996).
- 129 Santi, P. A. Light sheet fluorescence microscopy: a review. *J Histochem Cytochem* 59, 129-138, doi:10.1369/0022155410394857 (2011).
- 130 Howat, W. J. & Wilson, B. A. Tissue fixation and the effect of molecular fixatives on downstream staining procedures. *Methods* 70, 12-19, doi:10.1016/j.ymeth.2014.01.022 (2014).
- 131 Wehrl, H. F. *et al.* Assessment of murine brain tissue shrinkage caused by different histological fixatives using magnetic resonance and computed tomography imaging. *Histology and Histopathology* 30, 601-613, doi:10.14670/HH-30.601 (2015).
- 132 Weisbecker, V. Distortion in formalin-fixed brains: using geometric morphometrics to quantify the worst-case scenario in mice. *Brain Struct Funct* 217, 677-685, doi:10.1007/s00429-011-0366-1 (2012).
- 133 Zukor, K. A., Kent, D. T. & Odelberg, S. J. Fluorescent whole-mount method for visualizing three-dimensional relationships in intact and regenerating adult newt spinal cords. *Dev Dyn* 239, 3048-3057, doi:10.1002/dvdy.22441 (2010).
- 134 Omidian, H. & Park, K. Swelling agents and devices in oral drug delivery. *J. DRUG DEL. SCI. TECH.* 18, 83-93, doi:10.1016/S1773-2247(08)50016-5 (2008).
- 135 RHEIN, L. D., ROBBINS, C. R., FERNEE, K. & CANTORE, R. Surfactant Structure Effects on Swelling of Isolated Human Stratum Corneum. *Journal of the Society of Cosmetic Chemists* 37, 125-139 (1986).
- 136 Streletsky, K. & Phillies, G. D. J. Temperature Dependence of Triton X-100 Micelle Size and Hydration? *Langmuir* 11, 42-47, doi:10.1021/la00001a011 (1995).
- 137 Borges, A. C. *et al.* Synthesis and Photopolymerization of Tween 20 Methacrylate/N-vinyl-2-Pyrrolidone Blends. *Materials Science and Engineering: C* 32, 2235-2241, doi:10.1016/j.msec.2012.06.009 (2012).
- 138 Batista, J. N. M. *et al.* Controlling silicate meso-structures using sucupira oil as a new swelling agent. *Applied Surface Science* 258, 5111-5116, doi:10.1016/j.apsusc.2012.01.143 (2012).
- 139 Hashidzume, A. & Harada, A. in *Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials* (eds Shiro Kobayashi & Klaus Müllen) 1-5 (Springer Berlin Heidelberg, 2014).
- 140 Hansen, D., Haraguchi, M. & Alonso, A. Pharmaceutical properties of 'sucupira' (*Pterodon* spp.). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 46, 607-616 (2010).
- 141 Oliveira, A. E. *et al.* Development of a Larvicidal Nanoemulsion with *Pterodon emarginatus* Vogel Oil. *PLoS One* 11, e0145835, doi:10.1371/journal.pone.0145835 (2016).

-
- 142 Ambani, L. M., Jhung, J. W., Edelstein, L. M. & Van Woert, M. H. Quantification of melanin in hepatic and cardiac lipofuscin. *Experientia*. 33, 296-308 (1977).
- 143 Wang, H.-B., Zhang, H.-D., Chen, Y., Li, Y. & Gan, T. H₂O₂-mediated fluorescence quenching of double-stranded DNA templated copper nanoparticles for label-free and sensitive detection of glucose. *RSC Adv*. 5, 77906-77912, doi:10.1039/c5ra14852a (2015).
- 144 Schreiber, C. N. a. U. Photochemical and Non-Photochemical Quenching of Chlorophyll Fluorescence Induced by Hydrogen Peroxide. *Zeitschrift für Naturforschung C* 44, doi:10.1515/znc-1989-3-415 (1989).
- 145 Cavatorta, P., Favilla, R. & Mazzini, A. Fluorescence quenching of tryptophan and related compounds by hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* 578, 541-546, doi:10.1016/0005-2795(79)90185-5 (1979).
- 146 Shen, H. & Wu, W. Study of Melanin Bleaching After Immunohistochemistrof Melanin-containing Tissues. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 23, 303-307, doi:10.1097/PAI.0000000000000075. (2015).
- 147 Luise A. Cullen-McEwen, M. M. K., John Dowling, Warwick P. Anderson, John F. Bertram. Nephron Number, Renal Function, and Arterial Pressure in Aged GDNF Heterozygous Mice. *Hypertension* 41, 335-340 (2003).
- 148 Scholz, J. *et al.* Renal dendritic cells stimulate IL-10 production and attenuate nephrotoxic nephritis. *J Am Soc Nephrol* 19, 527-537, doi:10.1681/ASN.2007060684 (2008).
- 149 Murawski, I. J., Maina, R. W. & Gupta, I. R. The relationship between nephron number, kidney size and body weight in two inbred mouse strains. *Organogenesis*. 6, 189–194. (2010).
- 150 Baldelomar, E. J. *et al.* Phenotyping by magnetic resonance imaging nondestructively measures glomerular number and volume distribution in mice with and without nephron reduction. *Kidney Int* 89, 498-505, doi:10.1016/j.kint.2016.02.012 (2016).
- 151 Reddy, V., Bhandari, S. & Seymour, A. M. Myocardial function, energy provision, and carnitine deficiency in experimental uremia. *J Am Soc Nephrol* 18, 84-92, doi:10.1681/ASN.2005080876 (2007).
- 152 Mann, L. *et al.* CD11c.DTR mice develop a fatal fulminant myocarditis after local or systemic treatment with diphtheria toxin. *Eur J Immunol*, doi:10.1002/eji.201546245 (2016).
- 153 Pazzaglia, U. E. & Congiu, T. The cast imaging of the osteon lacunar-canalicular system and the implications with functional models of intracanalicular flow. *J Anat* 222, 193-202, doi:10.1111/joa.12004 (2013).
- 154 Finch, C. A. *The role of iron in hemoglobin synthesis*. (Washington (DC): National Academies Press (US), 1957).
- 155 Yin, T. & Li, L. The stem cell niches in bone. *J Clin Invest* 116, 1195-1201, doi:10.1172/JCI28568 (2006).
- 156 Fazeli, P. K. *et al.* Marrow fat and bone--new perspectives. *J Clin Endocrinol Metab* 98, 935-945, doi:10.1210/jc.2012-3634 (2013).
-

-
- 157 Nombela-Arrieta, C. *et al.* Quantitative imaging of haematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment. *Nat Cell Biol* 15, 533-543, doi:10.1038/ncb2730 (2013).
- 158 Bach-Gansmo, F. L. *et al.* Osteocyte lacunar properties and cortical microstructure in human iliac crest as a function of age and sex. *Bone* 91, 11-19, doi:10.1016/j.bone.2016.07.003 (2016).
- 159 Nyangoga, H., Mercier, P., Libouban, H., Basle, M. F. & Chappard, D. Three-dimensional characterization of the vascular bed in bone metastasis of the rat by microcomputed tomography (MicroCT). *PLoS One* 6, e17336, doi:10.1371/journal.pone.0017336 (2011).
- 160 Hannah, K. M., Thomas, C. D., Clement, J. G., De Carlo, F. & Peele, A. G. Bimodal distribution of osteocyte lacunar size in the human femoral cortex as revealed by micro-CT. *Bone* 47, 866-871, doi:10.1016/j.bone.2010.07.025 (2010).
- 161 Voide, R. *et al.* The importance of murine cortical bone microstructure for microcrack initiation and propagation. *Bone* 49, 1186-1193, doi:10.1016/j.bone.2011.08.011 (2011).
- 162 Simon, M. M. *et al.* A comparative phenotypic and genomic analysis of C57BL/6J and C57BL/6N mouse strains. *Genome Biol* 14, R82, doi:10.1186/gb-2013-14-7-r82 (2013).
- 163 Mekada, K. *et al.* Genetic differences among C57BL/6 substrains. *experimental animals* 58, 141-149 (2009).
- 164 Billiau, A. & Matthys, P. Collagen-induced arthritis and related animal models: how much of their pathogenesis is auto-immune, how much is auto-inflammatory? *Cytokine Growth Factor Rev* 22, 339-344, doi:10.1016/j.cytogfr.2011.11.003 (2011).
- 165 Geboes, L. *et al.* Freund's complete adjuvant induces arthritis in mice lacking a functional interferon-gamma receptor by triggering tumor necrosis factor alpha-driven osteoclastogenesis. *Arthritis Rheum* 56, 2595-2607, doi:10.1002/art.22791 (2007).
- 166 Wang, Z. *et al.* Role of IFN-gamma in induction of Foxp3 and conversion of CD4⁺ CD25⁻ T cells to CD4⁺ Tregs. *J Clin Invest* 116, 2434-2441, doi:10.1172/JCI25826 (2006).
- 167 Costa, C., Incio, J. & Soares, R. Angiogenesis and chronic inflammation: cause or consequence? *Angiogenesis* 10, 149-166, doi:10.1007/s10456-007-9074-0 (2007).
- 168 Shirinifard, A. *et al.* 3D quantitative analyses of angiogenic sprout growth dynamics. *Dev Dyn* 242, 518-526, doi:10.1002/dvdy.23946 (2013).
- 169 Bauer, A. L., Jackson, T. L. & Jiang, Y. Topography of extracellular matrix mediates vascular morphogenesis and migration speeds in angiogenesis. *PLoS Comput Biol* 5, e1000445, doi:10.1371/journal.pcbi.1000445 (2009).
- 170 Szekanecz, Z. & Koch, A. E. Mechanisms of Disease: angiogenesis in inflammatory diseases. *Nat Clin Pract Rheumatol* 3, 635-643, doi:10.1038/ncprheum0647 (2007).
-

-
- 171 McGonigle, J. S., Giachelli, C. M. & Scatena, M. Osteoprotegerin and RANKL differentially regulate angiogenesis and endothelial cell function. *Angiogenesis* 12, 35-46, doi:10.1007/s10456-008-9127-z (2009).
- 172 Liu, J., Wang, H. & Li, J. Inflammation and Inflammatory Cells in Myocardial Infarction and Reperfusion Injury: A Double-Edged Sword. *Clin Med Insights Cardiol* 10, 79-84, doi:10.4137/CMC.S33164 (2016).
- 173 Kay, L. J., Holland, T. M. & Platt, P. N. Stress fractures in rheumatoid arthritis: a case series and case-control study. *Ann Rheum Dis* 63, 1690-1692, doi:10.1136/ard.2003.010322 (2004).
- 174 Shim, J. *et al.* Outcome of balloon kyphoplasty for the treatment of osteoporotic vertebral compression fracture in patients with rheumatoid arthritis. *BMC Musculoskelet Disord* 17, 365, doi:10.1186/s12891-016-1215-4 (2016).
- 175 Wegierska, M. *et al.* Osteoporosis diagnostics in patients with rheumatoid arthritis. *Reumatologia* 54, 29-34, doi:10.5114/reum.2016.58759 (2016).
- 176 Carriero, A. *et al.* Altered lacunar and vascular porosity in osteogenesis imperfecta mouse bone as revealed by synchrotron tomography contributes to bone fragility. *Bone* 61, 116-124, doi:10.1016/j.bone.2013.12.020 (2014).
- 177 Sivalenka, R. R. & Jessberger, R. SWAP-70 regulates c-kit-induced mast cell activation, cell-cell adhesion, and migration. *Mol Cell Biol* 24, 10277-10288, doi:10.1128/MCB.24.23.10277-10288.2004 (2004).
- 178 V.J. Cvetkovic, S. J. N., J.S. Rajkovic, A.Lj. Zabar, P.J. Vasiljevic, Lj.B. Djordjevic, M.D. Trajanovic. A comparison of the microarchitecture of lower limb long bones between some animal models and humans: a review. *Veterinarni Medicina* 58, 339–351 (2013).
- 179 Qiu, S., Fyhrie, D. P., Palnitkar, S. & Rao, D. S. Histomorphometric assessment of Haversian canal and osteocyte lacunae in different-sized osteons in human rib. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 272, 520-525, doi:10.1002/ar.a.10058 (2003).
- 180 Enlow, D. H. Function of the haversian system. *The american journalk of anatomy* 110, 269-305 (1962).
- 181 Tommasini, S. M. *et al.* Changes in intracortical microporosities induced by pharmaceutical treatment of osteoporosis as detected by high resolution micro-CT. *Bone* 50, 596-604, doi:10.1016/j.bone.2011.12.012 (2012).
- 182 Chen, Q., Rho, J. Y., Fan, Z., Lauderkind, S. J. & Raghov, R. Congenital lack of COX-2 affects mechanical and geometric properties of bone in mice. *Calcif Tissue Int* 73, 387-392, doi:10.1007/s00223-002-0009-x (2003).
- 183 Muller, R. Hierarchical microimaging of bone structure and function. *Nat Rev Rheumatol* 5, 373-381, doi:10.1038/nrrheum.2009.107 (2009).
- 184 Zimmermann, E. A. *et al.* Age-related changes in the plasticity and toughness of human cortical bone at multiple length scales. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 14416-14421, doi:10.1073/pnas.1107966108 (2011).
- 185 Thompson, D. D. Age Changes in Bone Mineralization, Cortical Thickness, and Haversian Canal Area. *Calcif. Tissue Int.* 31, 5-11 (1980).
-

- 186 Hardcastle, S. A. *et al.* Osteophytes, enthesophytes, and high bone mass: a bone-forming triad with potential relevance in osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol* 66, 2429-2439, doi:10.1002/art.38729 (2014).
- 187 Rogers, J., Shepstone, L. & Dieppe, P. Bone formers: osteophyte and enthesophyte formation are positively associated. *Annals of the Rheumatic Diseases* 56, 85-90, doi: doi:10.1136/ard.56.2.85 (1997).
- 188 Sudol-Szopinska, I., Kwiatkowska, B., Prochorec-Sobieszek, M. & Maslinski, W. Enthesopathies and enthesitis. Part 1. Etiopathogenesis. *J Ultrason* 15, 72-84, doi:10.15557/JoU.2015.0006 (2015).
- 189 Sudol-Szopinska, I. *et al.* Enthesopathies and enthesitis. Part 2: Imaging studies. *J Ultrason* 15, 196-207, doi:10.15557/JoU.2015.0017 (2015).
- 190 Weiss, P. F. Update on enthesitis-related arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 28, 530-536, doi:10.1097/BOR.0000000000000313 (2016).
- 191 Melet, J. *et al.* Rituximab-induced T cell depletion in patients with rheumatoid arthritis: association with clinical response. *Arthritis Rheum* 65, 2783-2790, doi:10.1002/art.38107 (2013).

7 Anhang

7.1 Videomaterial und Datenblätter

Auf der letzten Seite des Einbandes ist eine CD beigefügt, die folgende Daten enthält:

- Videoanimationen der im Rahmen dieser Doktorarbeit generierten Daten
 - Video 1 - ECi gecleartes Herz
LSFM-Aufnahme eines Ethanol-ECi geclearten Herzens zeigt das Gewebe (Autofluoreszenz, grau) sowie Gefäßstrukturen (CD31, rot) in dem gesamten Organ.
 - Video 2 - ECi geclearte Niere
LSFM-Aufnahmen verschiedener Vergrößerungen zeigen die endothelialen Strukturen (CD31, rot) in einer gesunden Niere. Mittels kombinierter CLSM- und TPLSM-Aufnahmen können die vaskulären Strukturen (CD31, rot), Kollagenfasern (SHG, blau) und das Nierengewebe (Autofluoreszenz, grau) hoch aufgelöst visualisiert werden. Dabei sind die Endothelschädigungen, die durch die NTN-vermittelten Glomerulonephritis induziert wurden, ersichtlich.
 - Video 3 - Glomeruliquantifizierung
Die Glomeruli (CD31, rot) einer EtOH-ECi geclearten Niere werden mittels LSFM mikroskopiert und anschließend voll automatisiert quantifiziert (blau).
 - Video 4 - ECi geclearte Calvaria
Die Anwendung des EtOH-ECi-Vefahrens ermöglicht auch die Optimierung der optischen Durchlässigkeit harter Organe. Hier ist exemplarisch eine ganze Calvaria mittels LSFM mikroskopiert worden, wobei sowohl das Knochengewebe (Autofluoreszenz, grau) als auch die Vaskularisation des Knochens (CD31, rot) visualisiert werden konnten.
 - Video 5 - ECi geclearte Pfote
Exemplarische LSFM-Aufnahme einer EtOH-Eci geclearten Pfote, wobei sowohl der Knochen (Autofluoreszenz, grau) als auch die Knochenvaskularisation (CD31, rot) visualisiert wurden.
 - Video 6 - CD31-Färbung in der C57BL6J Tibia
Visualisierung der Endothelstrukturen (Cd31, rot) in der C57BL/6J Tibia (Autofluoreszenz, grau) mittels LSFM.
 - Video 7 - CD31, Sca1 Färbungen in der Tibia
Die Visualisierung von Venen (CD31, blau) und Arterien (Sca1, rot) in der C57BL6/J Tibia und dem umliegenden Gewebe (Autofluoreszenz grau) mittels LSFM ermöglicht die Identifizierung einer Hauptarterie an der Diaphyse, sowie die Darstellung des venösen Zentralgefäßes, das an der Diaphyse aus der Tibia austritt.
 - Video 8 - venöse und arterielle TKGs in der Fibula
Die Optimierung der optischen Durchlässigkeit ermöglicht größere optische Eindringtiefen, weshalb hier mittels kombinierter CLSM und TPLSM die venösen (CD31, blau) und arteriellen (Sca1, rot) Gefäßstrukturen in der C57BL/6J Fibula (SHG, grau) visualisiert werden können.
 - Video 9 - Übergang Venen zu Arterien in der Fibula
Visualisierung der arteriellen (Sca1, rot) und venösen (CD31, blau) Gefäßverbindungen in der C57BL/6J Fibula (SHG, grau) mittels kombinierter CLSM und TPLSM.
 - Video 10 - Verbindungen der TKGs zum Perisot in der Tibia

Die kombinierte CLSM und TPLSM Aufnahme einer geclearten Tibia zeigt das venöse (CD31, blau) und arterielle (Sca1, rot) Gefäßnetzwerk im umliegenden Gewebe und seine Verbindungen mit dem Knochen (SHG, grau).

- Video 11 - intra-vitale TPLSM des Knochenmarks
Intra-vitale TPLSM-Aufnahme des Knochenmarks einer LysM-EGFP Maus zeigt GFP⁺ Zellen (grün) im endostalen Bereich des Knochens (SHG, grau), sowie die dichte Vaskularisation (Rhodamin Dextran, rot) des Knochenmarks und TKGs.
- Video 12 - Blutfluss und Zellmobilisierung über den Zentralsinus
Intra-vitale TPLSM des aus dem Knochen (SHG, grau) austretenden Zentralsinus (Rhodamin Dextran, rot) einer LysM-EGFP Maus. Mit dem Blutstrom werden zahlreiche GFP⁺ Zellen aus dem Knochen transportiert.
- Video 13 - intra-vitale TPLSM der G-CSF Mobilisierung
Mittels intra-vitaler TPLSM wird ersichtlich, dass GFP⁺ Zellen (grün) einer LysM-EGFP Maus zwar an TKGs (Rhodamin Dextran, rot) adherieren, aber erst nach Stimulation mittels G-CSF durch diese Gefäße aus dem Knochen (SHG, braun) auswandern.
- Video 14 - Migration von Immunzellen durch TKGs
Mittels der TPLSM können GFP⁺ Zellen von LysM-EGFP Mäusen visualisiert werden, die nach G-CSF Stimulation mit dem Blutstrom aber auch gegen den Blutstrom durch die TKGs (Rhodamin Dextran, rot) aus dem Knochen (SHG, grau) auswandern können.
- Video 15 – Visualisierung des Blutflusses in verschiedene Gefäßen des kompakten Knochens
Die Hochgeschwindigkeits-TPLSM mittels eines resonanten Scanners ermöglicht die Visualisierung des Blutflusses (Rhodamin Dextran/Q-Tracker655, rot) und Immunzellen (blau/grün) durch die verschiedenen Blutgefäße des kompakten Knochens (SHG, braun), die wie TKGs, die Hauptarterien und den aus dem Knochen austretenden Zentralsinus.
- Video 16 – MRT-Aufnahme des humanen Unterschenkels
Die Kolorierung der 7T MRT-Aufnahmen eines humanen Unterschenkels basieren auf Kontrastunterschieden der detektierten Strukturen. Somit kann die Muskulatur (braun) von kompaktem Knochen (grau) und Blutgefäßen unterschieden werden. Anhand von Kontrastunterschieden der Gefäße wurde von venösen (blau) und arteriellen (rot) Gefäßen ausgegangen. Somit konnten mutmaßlich verschiedene Gefäßtypen in der Muskulatur und auch innerhalb der Knochen identifiziert werden.
- Sicherheitsdatenblätter (SDB) diverser Chemikalien und Reagenzien
 - SDB 1 - 1,3,5-Trimethylbenzene
 - SDB 2 - Benzylbenzoat
 - SDB 3 - Wasserstoffperoxid Lösung
 - SDB 4 - Dichlormethan
 - SDB 5 - Trichlorisocyanursäure

7.2 Danksagungen

Die Danksagungen sind in der Online-Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

7.3 Kooperationen im Rahmen der Dissertation

7.3.1 Optical-projection tomography (OPT) geclearter Röhrenknochen

Die Probengenerierung und Visualisierung von Röhrenknochen mittels OPT erfolgte in gemeinschaftlicher Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Stein am Theodor-Kocher Institut, Universität Bern. Die Datenaufbereitung mittels Imaris erfolgte in Eigenleistung am Institut für experimentelle Immunologie und Bildgebung, Universität Duisburg-Essen.

7.3.2 Elektronenmikroskopische (ELMI) Aufnahmen von Röhrenknochen

Die Proben wurden in Eigenleistung generiert, dann durch die Arbeitsgruppe Rhode am Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig aufbereitet und mikroskopiert.

7.3.3 Induktion der nephrotoxischen Serum-Nephritis

Die Induktion der nephrotoxischen Serum-Nephritis, sowie die Urinalysen bezüglich der Albumin- und Kreatinin-Konzentrationen erfolgten durch die Arbeitsgruppe Kurts am Institut für experimentelle Immunologie, Universitätsklinikum Bonn. Die Blutgefäßfärbungen und Probenentnahmen erfolgten in gemeinschaftlicher Zusammenarbeit am Standort Bonn. Die weitere Probenaufbereitung (optical clearing), mikroskopische Aufnahmen und Analysen erfolgten durch Eigenleistung am Institut für experimentelle Immunologie und Bildgebung, Universität Duisburg-Essen. Die Etablierung eines Algorithmus zur voll automatisierten Quantifizierung der LSM-Daten erfolgte durch die Arbeitsgruppe Figge am Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie, Hans-Knöll Institut, Jena.

7.3.4 Induktion der rheumatoiden Arthritis

Die Induktion der rheumatoiden Arthritis, sowie die Gewichtskontrollen und das Scoring erfolgten durch die Arbeitsgruppe Kamradt am Institut für Immunologie, Universitätsklinikum Jena. Die Probenentnahme erfolgte in gemeinschaftlicher Zusammenarbeit in Jena, die anschließende Aufbereitung (optical clearing), Mikroskopie und Analyse in Eigenleistung am Institut für experimentelle Immunologie und Bildgebung, Universität Duisburg-Essen.

7.3.5 Analysen osteopetrotischer Knochen anhand des SWAP70^{-/-}-Mausmodells

Das SWAP70^{-/-}-Mausmodell wurde uns von der Arbeitsgruppe Garbe, Zentrum für Regenerative Therapien, Technische Universität Dresden, zur Verfügung gestellt. Sämtliche Versuche (G-CSF Mobilisierung, Durchflusszytometrie, optical clearing, LSM, LSM-Analysen) erfolgten in Eigenleistung am Institut für experimentelle Immunologie und Bildgebung, Universität Duisburg-Essen.

7.3.6 Analysen osteoporotischer Knochen anhand des hTNFtg-Mausmodells

Das hTNFtg-Mausmodell wurde uns von der Arbeitsgruppe Schett, Medizinische Klinik 3, Universitätsklinikum Erlangen, zur Verfügung gestellt. Die G-CSF Mobilisierung, sowie die durchflusszytometrischen Messungen und Probengenerierungen für LSM-Analysen erfolgten in gemeinschaftlicher Zusammenarbeit in Erlangen, die weitere Probenaufbereitung (optical clearing), LSM und Datenanalyse erfolgte in Eigenleistung am Institut für experimentelle Immunologie und Bildgebung, Universität Duisburg-Essen.

7.3.7 7Tesla-Magnetresonanztomographie (7T-MRT) Daten

Die in dieser Dissertation gezeigten 7T-MRT Daten sind in enger Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Quick am Erwin-L.-Hahn Institut für Magnetresonanz des Universitätsklinikums Essen generiert worden. Die Datenaufbereitung mittels Imaris erfolgte in Eigenleistung am Institut für experimentelle Immunologie und Bildgebung, Universität Duisburg-Essen.

7.4 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

7.5 Eidesstattliche Erklärungen

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, g der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Nachweis und Charakterisierung des geschlossenen Blutgefäßsystems in murinen Röhrenknochen“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Anika Klingberg befürworte.

Essen, den _____

Prof. Dr. Matthias Gunzer

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den _____

Anika Klingberg

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, e und g der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den _____

Anika Klingberg
